

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Systematische Untersuchung des Einflusses von Iloprost auf die durch
Ischämie und Reperfusion geschädigte marginale Leber im
extrakorporalen Perfusionsmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tanoa Maria Junge

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Puhl
 2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Heise
 3. Prof. Dr. med. K.-D. Schaser

Datum der Promotion: 30.11.2012

INHALTSVERZEICHNIS	1
<hr/>	
1 EINFÜHRUNG	3
<hr/>	
1.1 Prostazyklin – Stellung unter den Prostaglandinen, Bildung und Wirkung	3
1.2 Iloprost als synthetische Prostazyklinanalogon und die Anwendung von Prostazyklinalaloga an ausgewählten Beispielen	9
1.3 Verwendung von Marginalorganen in der Lebertransplantation	10
1.4 Die isolierte extrakorporale Leberperfusion	16
2 ABLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	19
<hr/>	
2.1 Zielsetzung	19
3 MATERIAL UND METHODEN	21
<hr/>	
3.1 Die Leberexplantation	21
3.2 Einteilung der Versuchsgruppen	24
3.3 Das Perfusionsmodell	25
3.3.1 Der Perfusionskreislauf	25
3.3.2 Das Perfusat	26
3.3.3 Die Organperfusion	27
3.4 Untersuchungsprogramm	28
3.4.1 Überblick über das Untersuchungsprogramm	28
3.4.2 Biochemische Parameter	28
3.4.3 Blutgasanalyse	29
3.4.4 Bilanzierung der Galleproduktion	29
3.4.5 Makroskopische Beurteilung der Lebern	29
3.4.6 Messung der Gewichts Differenz	30
3.4.7 Messung der Makrohämodynamik	30
3.4.8 Messung der Mikrozirkulation	31
3.4.9 Molekularbiologische Analysen	31
3.5 Die Auswertung	37
3.5.1 Beschreibung der Versuchsergebnisse und der Statistik	37
3.5.2 Berechnung der Flusswerte	38
3.5.3 Berechnung des Sauerstoffverbrauchs	38
4 ERGEBNISSE	39
<hr/>	
4.1 Galleproduktion	39
4.2 Sauerstoffverbrauch	40
4.3 Harnstoff	42
4.4 Glucose	44
4.5 Makrohämodynamik	45
4.5.1 Perfusatfluss pro Gramm Lebergewicht	45
4.5.2 Anteil der Arterie am Gesamtfluss pro Gramm Lebergewicht	46
4.5.3 Peripherer Widerstand pro Gramm Lebergewicht	47
4.6 Mikrozirkulation	49

4.6.1	Tiefer Gewebefluss absolut	51
4.7	Makroskopische Beurteilung der Lebern	52
4.8	Prozentuale Gewichts­differenz	54
4.9	Mediatoren	54
4.9.1	TNF- α	54
4.9.2	MPO	55
4.9.3	RsNO	56
5 DISKUSSION		58
5.1	Bewertung des Versuchsaufbaus	58
5.2	Galleproduktion	63
5.3	Sauerstoffverbrauch	66
5.4	Harnstoffsynthese	70
5.5	Glucosestoffwechsel	71
5.6	Hämodynamik	72
5.6.1	Makrohämodynamik	72
5.6.2	Mikrohämodynamik	77
5.7	Makroskopie-Score und Gewichts­differenz	79
5.8	Mediatoren	80
5.8.1	TNF- α	80
5.8.2	MPO	82
5.8.3	RsNO	83
6 ZUSAMMENFASSUNG		85
7 LITERATUR		87
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		105
9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		108
10 LEBENSLAUF		109
11 DANKSAGUNG		110

1 EINLEITUNG

Die orthotope Lebertransplantation zur Behandlung chronischer fortgeschrittener oder fulminant verlaufender Lebererkrankungen stellt nach der Nierentransplantation die zweitgrößte Gruppe der in Deutschland jährlich durchgeführten Organverpflanzungen dar.

Die Diskrepanz zwischen dem Organbedarf und den tatsächlich verfügbaren Spenderorganen führte in den letzten Jahren dazu, dass sich der Anteil der auf der Warteliste versterbenden Patienten erhöhte. In Deutschland weist zwar der Trend seit mehr als zehn Jahren einen steten Anstieg an orthotopen Lebertransplantationen auf, die jedoch der Zahl der Neuanmeldungen für eine Lebertransplantation nicht Rechnung tragen kann. Um dem chronischen Organmangel in der Lebertransplantationschirurgie zu begegnen, wird unter anderem die Transplantation von Marginalorganen zur Erweiterung des Spenderpools favorisiert. Unter den Bedingungen der Organknappheit und bei zunehmendem Einsatz grenzwertiger Spenderorgane stellt die Schädigung der Leber durch Ischämie/Reperfusion eines der Schlüsselprobleme in der Transplantationschirurgie dar.

Iloprost als stabiles Prostazyklinanalogon scheint besonders geeignet, sowohl die Konditionierung grenzwertiger Spenderorgane als auch die postoperative Behandlung initial schlecht funktionierender oder unzureichend perfundierter Organe zu optimieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der Überlegenheit eines optimalen Therapieregimes, wobei die Zeitpunkte der Prostaglandintherapie variierten. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Spendervorbehandlung, der Modifizierung der Konservierungslösung und der postoperativen Gabe in das rezirkulierende artifizielle Leberperfusionssystem. Untersucht wurde der Einfluss auf Funktions- und Schädigungsparameter von Lebern in vier Gruppen im Modell der normothermen isolierten extrakorporalen Leberperfusion nach 20 Stunden Kaltischämiekonservierung in HTK. Als Fazit war die Empfehlung für ein klinisches Behandlungskonzept abzuleiten, welches am zweckmäßigsten und sinnvollsten der Verbesserung der Leberfunktion und der Minimierung der Schädigung im vorgestellten Modell der hepatischen Ischämie/Reperfusionsschädigung dient.

1.1 Prostazyklin – Stellung unter den Prostaglandinen, Bildung und Wirkung

Prostanoide sind ubiquitär vorkommende zyklische Lipidmediatoren, die aus linearen

mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z.B. Arachidonsäure, durch enzymatische Cyclooxygenierung generiert werden. Zusammen mit den Leukotrienen werden sie auch als Eicosanoide bezeichnet. Die basale Struktureinheit der Prostaglandine ist die prostanoide Säure. Alle Prostaglandine besitzen 20 Kohlenstoffatome und außer Thromboxan einen 5-gliedrigen Cyclopentanring. Substitute an diesem Ring bestimmen die Unterschiede zwischen den Hauptklassen der Prostaglandine, die mit Großbuchstaben klassifiziert werden: PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , TXA_2 (Thromboxan) und PGI_2 (Prostazyklin), wobei PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 ubiquitär in den meisten humanen Organsystemen anzutreffen sind. Arachidonsäure unterliegt einer Vielzahl enzymatisch gesteuerter Vorgänge mit variierenden Enzymen in den unterschiedlichen Zellformen und Zellkompartimenten (Chlopicki, Gryglewski, 2004). Sie wird durch die membrangebundenen Phospholipasen, hauptsächlich Phospholipase A2, aus der zellulären Phospholipidmembran abgespalten. Stimuli, die die Aktivierung der Phospholipasen bewirken, sind mannigfaltig, bspw. Infektionen, Entzündungen, Hormone, Immunkomplexe, mechanisches Trauma.

Über die zytosolisch vorkommende Lipoyxygenase werden bspw. zytotoxische Leukotriene gebildet. Die sauerstoffabhängige PGH-Synthase, auch Cyclooxygenase (COX) genannt, die in zwei Isoformen, der konstitutiven, ubiquitär vorkommenden COX-1 (Cyclooxygenase-1) und der induzierbaren COX-2 (Cyclooxygenase-2) vorkommt, wurde 1991 entdeckt (Sirois, Richards, 1992). Sie synthetisiert die Prostaglandin-Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 . In gesunden Endothelzellen wird vorherrschend die COX-1-Isomerase gefunden (Mitchell, Warner 2006).

PGH_2 ist ein instabiles Zwischenprodukt und dient in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp und dessen Enzymausstattung als Substrat für unterschiedliche mikrosomale Synthesen, wie z.B. der Thromboxan- und der Prostazyklinsynthase. Es ist vielfach gezeigt worden, dass Endothelien hauptsächlich PGI_2 bilden, da die PGI -Synthase dort die dominante terminale Isomerase des Prostaglandinstoffwechsels darstellt (Schildknecht, Ullrich 2009). Endothelien sind jedoch auch zur Synthese von Thromboxan (TXA_2) in der Lage (Bustos et al., 1997), das jedoch in überwiegendem Maß von Thrombozyten gebildet wird. Im Rahmen der Gefäßhomöostase kommt nun der Prostanoidsynthese, verschiedentlich reguliert und moduliert durch Enzyminduktion, eine entscheidende Bedeutung zu. Inflammation oder vermehrte Scherkräfte bewirken bspw. die Hochregulation der endothelialen COX-2-Expression (Camacho et al., 1998). Verbunden damit ist die verstärkte Synthese von PGI_2 (Shinmura et al., 2000),

zusätzlich durch eine selektive Hochregulation der Prostazyklinsynthese realisiert, als möglicher Schutzmechanismus des Endothels vor Schädigung (Caughey et al., 2001) zu bewerten.

Die Prostaglandine werden nach ihrer Synthetisierung ausgeschüttet, eine intrazelluläre Speicherung findet nicht statt. Physiologischerweise finden sich im zirkulierenden Blutsystem nur sehr geringe Mengen, die schnell hydrolysiert und über weitere Zwischenprodukte katabolisiert werden, um dann vorwiegend renal zu eliminiert werden. Die folgende Tabelle zeigt exemplarisch die wichtigsten Prostaglandine, ihre hauptsächlichen Syntheseorte und ihre wesentlichen Wirkungen.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Prostaglandine und ihrer physiologischen Rolle in den Hauptorgansystemen, nachgedruckt aus: Miller, 2006

System	Mediator	Hauptorte der Synthese	Primäre Effekte
Kardiovaskulär	Prostazyklin	Endothelzellen	Vasodilatation
	Thromboxan	Thrombozyten	Vasokonstriktion
Renal	Prostazyklin	Renaler Kortex	Vasodilatation
	PGE ₂	Renales Mark	Salz- und Wasser- ausscheidung
Gastrointestinal	PGE ₂	Gastrale Mukosa	Zytoprotektion
Hämatologisch	Prostazyklin	Endothelzellen	Thrombozytende- aggregation
	Thromboxan	Thrombozyten	Thrombozyten- aggregation
Respiratorisch	Prostazyklin	Endothelzellen	Vasodilatation
Muskuloskeletal	PGE ₂	Osteoblasten	Knochenresorption, Knochenformation
Reproduktiv	PGE ₂	Seminalblase	Erektion, Ejakulation, Spermientransport
	PGE ₂ , PGF ₂	Fetale Membranen Uterus	Befruchtung, Ovulation Entbindung, Menstrua- tion
Neurologisch	PGE ₂	unbekannt	Fieber, Hyperalgesie

Prostazyklin oder Prostaglandin I₂ (PGI₂), 1976 durch Moncada et al. bei der Untersuchung von Gefäßwänden und deren Produktion von instabilen Prostanoiden und Thromboxan A₂ (TXA₂) zufällig entdeckt und charakterisiert (Moncada et al., 1976), ist ein instabiles Prostaglandin mit einer Halbwertszeit von vier Minuten bei 37 °C. Gebildet in Gefäßwänden, hauptsächlich vom Endothel, in geringerem Maße auch von glatten Gefäßmuskelzellen, ist es der natürliche Gegenspieler des Thromboxans (TXA₂), das als starker Vasokonstriktor auch zytotoxische und thrombogene Eigenschaften besitzt (Bhagwat et al., 1985). Prostazyklin als ein wichtiger endogener Regulator in der Gefäßhomöostase wirkt über die Vasodilatation aller Gefäßbetten (Moncada, Vane 1979), die Inhibition der Thrombozytenaggregation und die Dispersion bestehender zirkulierender Plättchenaggregate (Szczeplik et al., 1978). Verschiedene

Studien haben gezeigt, dass der vasodilatatorische Effekt von Prostazyklin zum Teil abhängig von der endothelialen NO-Freisetzung ist (Armstead 1995).

Physiologischerweise wirken Prostaglandine auto- und parakrin. Viele ihrer Effekte werden intrazellulär vermittelt. Prostaglandinrezeptoren finden sich im Organismus an den Plasmamembranen nahezu aller Zellen, und obwohl die Rezeptoren eine strukturelle Verwandtschaft aufweisen, sind sie doch spezifisch für die jeweilige Prostaglandinsubklasse (Coleman et al., 1994). Prostazyklin wirkt über zellmembranständige Gs-Protein-gekoppelte IP-Rezeptoren, die vermehrt auf Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen zu finden sind. Die Aktivierung von IP-Rezeptoren führt über eine Gs-Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase zur intrazellulären Erhöhung von cAMP, das eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionswegen aktiviert (Narumiya et al., 1999). Es wird u.a. über die Phosphorylierung von Proteinkinase A (PKA) in vielen Zielzellen der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel gesenkt (Schwarz et al., 2001), was in glatten Gefäßmuskelzellen die Relaxation bewirkt.

Hayes et al. beschrieben neben der Gs-Protein-Kopplung auch die Assoziation des IP-Rezeptors mit anderen G-Proteinen gemäß einer Modifikation des C-terminalen Endes (Gi und Gq) (Hayes et al., 1999).

Hinsichtlich des wiederholten Einsatzes von Prostazyklin und seiner Analoga wird angenommen, dass eine Desensibilisierung, Internalisierung und Sequestration des IP-Rezeptors durch die Rezeptoragonisten erfolgt (Smyth et al., 2000), was für die Langzeiteffektivität einer Behandlung mit PGI_2 -Analoga relevant sein könnte.

Prostazyklin bindet an IP-, aber auch an Vasokonstriktion-vermittelnde EP1-, EP3- (Zhang, Hintze 2006) und den Vasodilatation-vermittelnden EP4-Rezeptor (Narumiya et al. 1999; Lai et al., 2008). Sowohl für das Endothel als auch für die glatten Gefäßmuskelzellen ist das Vorkommen der verschiedenen Prostanoidrezeptoren und ihrer Subtypen beschrieben (Alfranca et al., 2006). Xavier et al. verweisen in ihrer Arbeit auf die Interaktion von PGI_2 mit dem Thromboxan A_2 -Rezeptor (TP-Rezeptor) an glatten Gefäßmuskelzellen, welcher die Vasokonstriktion fördert (Xavier et al., 2009). Zugleich wird auf die Modulation der Vasokonstriktion durch Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel, vermittelt durch PGI_2 -IP-Aktivierung hingewiesen. Dies würde eine zentrale, möglicherweise eine dualistische Rolle von Prostazyklin in der Regulation der Gefäßhomöostase je nach Rezeptorausstattung unterstreichen. Die Arbeit von Mitchell et al. kommt zusammenfassend zu dem Schluss, dass die Bindung von PGI_2 an EP-

und TP-Rezeptoren eher von untergeordneter Bedeutung ist (Mitchell et al., 2008).

Prostazyklin weist neben seinem hohen vasodilatatorischen und antiaggregatorischen Potential noch andere bedeutende Eigenschaften auf. Der membranstabilisierende Effekt, der PGI₂ zugeschrieben wird, kann durch die Protektion membranständiger Ca-Na-ATPasen und einer verminderten Lipidperoxidation erklärt werden (Goto et al., 1993).

Die Regulation von Wachstum, Fibrose und Apoptose durch PGI₂ über IP- und PPAR-Signaltransduktionswege ist hinlänglich bekannt (Li et al., 2004; Hatae et al., 2001). Neben den IP-Rezeptoren wirken Prostazyklin und seine Analoga auch als Agonisten an intrazellulären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) (Hatae et al., 2001). Der komplexe Weg der Aktivierung dieser Rezeptoren führt über Dissoziation von Korepressoren, über Rekrutierung von Koaktivatoren und Bildung von Dimeren mit anderen Rezeptoren zur Bindung an Zielgene im Zellkern, wo dann deren Transkription moduliert werden kann. Auch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und spezieller die Verhinderung der Transkription proinflammatorischer Gene gehören zum Wirkspektrum von PPAR (Mitchell et al., 2008).

Prostazyklin reguliert über die beschriebenen Rezeptoren das Gefäßwand-Remodelling durch Kontrolle der Proliferation, Migration und Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen (Fetalvero et al., 2007), begrenzt die Intimahyperplasie und unterdrückt die profibrotische/proliferative Zytokinausschüttung aus Fibroblasten (Lovgren et al., 2006).

Unter der Eigenschaft der Zytoprotektion werden noch verschiedene andere positive Effekte, die im Rahmen von Ischämie/Reperfusionsschäden verschiedener Organsysteme beobachtet wurden, und die wichtige, noch nicht vollständig verstandene Rolle als Mediator bei Inflammationsprozessen subsummiert. Schon Ende der 80er Jahre war die vermeintliche zytoprotektive Eigenschaft von Prostazyklin Gegenstand die umfangreicher Studien. Das Erklärungsspektrum putativer Mechanismen reichte von der Hemmung der Katecholaminausschüttung aus sympathischen Nervenendigungen, untersucht am Kaninchenherzen (Funke, Schrör 1985), über die Konservierung der mitochondrialen Funktion und der Aktivität der Superoxid-Dismutase verbunden mit der Reduktion oxidativen Stresses (Ferrari et al., 1989) hin zur Blockade stimulierter Makrophagen (Kawada et al., 1990). Weiterhin wurde eine reduzierte Akkumulation von Neutrophilen in inflammatorisch alterierten Geweben und eine damit einhergehende Hemmung der Freisetzung von Proteasen und freien Sauerstoffradikalen (Harada et al.,

1999) beobachtet. So können Prostaglandine die Adhärenz von Leukozyten am Endothel und deren transendotheliale Migration, die von verschiedenen Zytokinen initiiert werden, durch Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen bewirken (Della Bella et al., 2001). Die Inhibition der Zytokinsynthese in der Gewebeinflammation ist einer der Schlüsselfaktoren, die wahrscheinlich für die zellprotektive Prostazyklinwirkung verantwortlich zeichnen (Kunkel et al., 1988). Die Synthese von TNF- α , einem multifunktionalen, vornehmlich von aktivierten Makrophagen gebildeten Zytokin mit zentraler Bedeutung bei der Vermittlung von Entzündungs- und Immunreaktionen jedweder Art (Baker, Reddy, 1998), wird durch Prostazyklin, an stimulierten Monozyten gezeigt, auf verschiedenen Ebenen gehemmt (Jörres et al., 1997; Crutchley et al., 1994).

Zytokintoxizität und damit verbundener Zelluntergang werden durch eine Vielzahl zellspezifischer Mediatoren, deren Zusammenwirken in zahlreichen Kaskaden funktioniert, vermittelt. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg ist der über NF κ B, der als einer der Haupttranskriptionsfaktor bspw. über die Hochregulation von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) in den Zelltod pankreatischer Inselzellen verursacht (Darville, Eizirik 1998). Prostaglandine hemmen die Aktivität der κ B-Kinase (IKK), reduzieren die NF κ B-Aktivität und wirken damit hemmend auf dessen Translokation in den Nukleus (Rossi et al., 2000). Offensichtlich kann die PGI₂-vermittelte Suppression des zytokin-induzierter NF κ B-iNOS-Pathway (Petrova et al., 1999) über Regulation von Caspasen und anderen Mediatoren mitochondrialen als auch endoplasmatischen Stress und damit den Zelltod verhindern (Gurgul-Convey, Lenzen 2010). Chen et al. konnten zeigen, dass Prostazyklin die Translokation von PPAR- α aus dem Zytosol in den Nukleus bewirkt, und die NF κ B-induzierte TNF- α -Aktivierung im Anschluss an die I/R-Schädigung der Niere abschwächen kann (Chen et al., 2009). Die Apoptose als ATP-abhängiger Zelltod wird durch intra- oder extrazelluläre Signale ausgelöst. Die TNF-Rezeptorfamilie kann über die Aktivierung von Caspasen Apoptose vermitteln (Reed JC, 2000). Dieser über Caspasen vermittelte Zelltod tritt auch während der Ischämie/Reperfusionsschädigung von Lebern auf (Rentsch et al., 2001). Ob PGI₂ seine Funktion als Apoptoseinhibitor über die Regulation von Caspaseaktivitäten ausübt (Gurgul-Conveyl, Lenzen, 2010) und so zur Begrenzung des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens beiträgt, kann vermutet werden.

Der protektive Effekte von PGI₂ durch die Regulation antiapoptotischer Gene in unterschiedlichen Zelltypen war Gegenstand zahlreicher weiterer Studien (Liou et al.,

2007). So ist bspw. der antiapoptotische Effekt auf Tubuluszellen nach Gabe von Röntgenkontrastmittel und auf embryonale Mauszellen gezeigt worden (Yano et al., 2004; Pakrasi, Jain 2008).

In verschiedenen Untersuchungen wurde die Rolle von PGI_2 als Regulator von Wachstum, Regeneration und Reparaturprozessen gezeigt. PGI_2 wirkt dabei auch proangiogenetisch, indem es die therapeutische Angiogenese stimuliert als auch das Endothelzellüberleben fördert (Hiraoka et al., 2003; Liou et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnte der positive Einfluss von Prostazyklin auf Inflammation generell und auf Ischämie/Reperfusionsschäden im speziellen, die ja unweigerlich eng mit reparativen und angiogenetischen Prozessen verknüpft sind, belegt werden (Wheeler-Jones et al., 2009).

1.2 Iloprost als synthetisches Prostazyklin-Analogon und die Anwendung von Postazyklinanaloga an ausgewählten Beispielen

Iloprost, als ein synthetisches Prostazyklin-Analogon in intravenöser oder inhalativer Form applizierbar, besitzt ein identisches Wirkprofil gegenüber PGI_2 . Es ist jedoch wesentlich stabiler mit einer erheblich längeren biologischer Halbwertszeit von 20-30 Minuten nach i.v. Gabe. Die Prostazyklinanaloga im Allgemeinen liegen in verschiedenen chemischen Formatierungen vor und besitzen damit auch unterschiedliche Rezeptorbindungsaffinitäten.

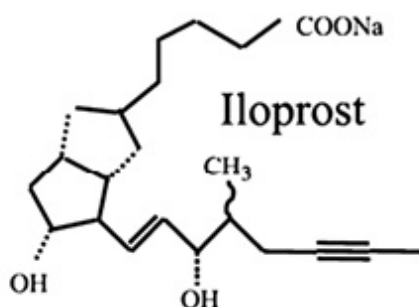


Abbildung 1: Chemische Struktur von Iloprost, nachgedruckt von Olschewski et al., 2004.

Prostazyklin besitzt viele wünschenswerte Effekte auf das pulmonale Gefäßbett, was seinen klinischen Einsatz in der Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) so wirksam macht. Seit 1995 als Epoprostenol in den USA für die PAH-Therapie zugelassen wurde, sind Prostazyklin-Analoga trotz neuer Therapiestrategien, die auf Endothelin- oder NO-Signalwege zurückgreifen, die Erstlinientherapie für alle Patienten

in hochgradigen Stadien (McLaughlin et al., 1999). Die größten klinischen Erfahrungen mit Iloprost wurden bisher in der Behandlung der kritischen Ischämie der unteren Extremität als Folge mikro- und makroangiopathischer Gefäßveränderungen gemacht (Cappelli et al., 1999). Hier zeigt sich, dass Prostanoiden effektiv zur Heilung von Ulcera und zur Schmerzlinderung beitragen. Hinsichtlich größerer Amputationen werden günstige Resultate erzielt. Der Nutzen auf lange Sicht und die Ungefährlichkeit ihrer länger- oder langfristigen Nutzung sind jedoch nicht belegt (Ruffolo et al., 2010). Andere klinische Anwendungsgebiete von Iloprost umfassen die Behandlung der Thrombangiitis obliterans und des Raynaud-Phänomens.

Mulvin et al. erbrachten schon 1990 im Tierexperiment mit Ratten den Nachweis, dass Iloprost als Bestandteil der Konservierungslösung Lungentransplantate vor Ischämieschäden schützen kann (Mulvin et al., 1990). Auch auf dem Gebiet der Lebertransplantation konnte für Prostacyclin in der Spendervorbehandlung (Klein et al. 1999) sowie als Zusatz zur Konservierungslösung (Sanchez-Urdazpal et al., 1991) ein günstigerer postoperativer Verlauf mit besserer Organperfusion, niedrigerem hepatozellulärem Schaden und im langfristigen Verlauf besserer Organfunktion gezeigt werden. Bei initial schlechter Organfunktion nach der Transplantation oder Transplantatversagen konnten Behandlungserfolge mit PGI₂ erzielt werden (Briegel et al. 1992).

1.3 Verwendung von Marginalorganen in der Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation stellt die einzig effektive Behandlung von Lebererkrankungen im Endstadium dar. In den letzten Jahren konnten nach Transplantation von Lebern postmortaler Spender 1-Jahresüberlebensraten von 90 % und 5-Jahresüberlebensraten von 75 % erreicht werden (Perera et al., 2009). Dabei steht die wachsende Zahl von Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation in eklatantem Missverhältnis zur Zahl der verfügbaren Spenderorgane. Durch die Verwendung von Splitleberorganen, Leberlebendspenden, Dominotransplantationen und den Einsatz von marginalen Organen wird der Spenderpool erweitert.

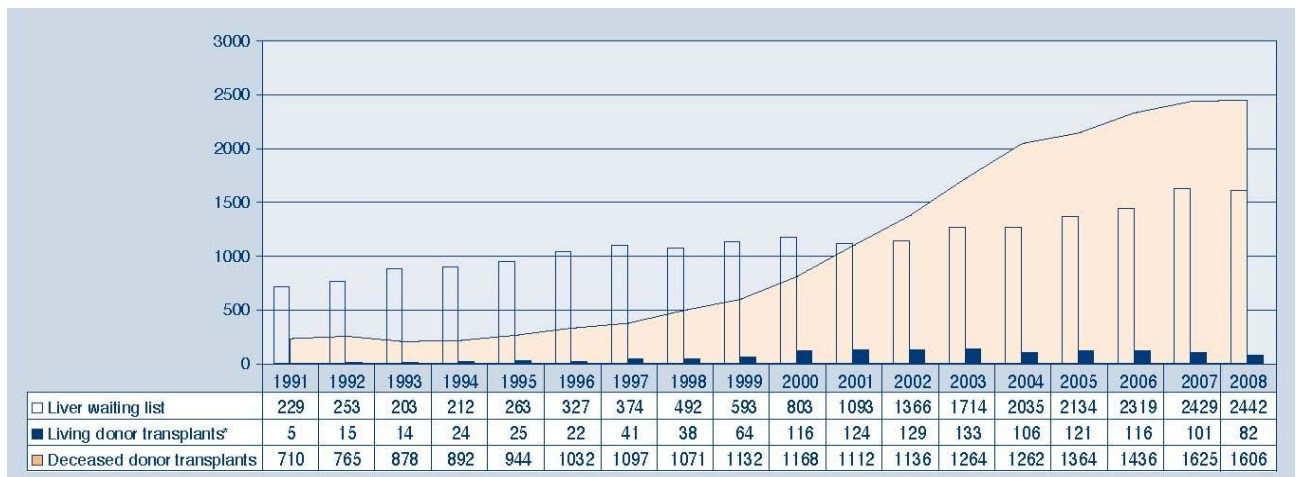


Abbildung 2: Dynamische Entwicklung der Eurotransplant-Warteliste für eine Leber und der Lebertransplantationen von 1991-2008, * einschließlich Domino-Transplantationen, Eurotransplant, Annual Report, 2008

So führen steigender Bedarf an Spenderlebern und wachsende Mortalität von Patienten auf der Transplantationswarteliste dazu, dass Marginalorgane heutzutage bis zu ca. 50 % aller verfügbaren Transplantationslebern ausmachen. Bis heute existiert allerdings keine allgemeingültige Definition einer Leber als Marginalorgan. So obliegt die Entscheidung zur Transplantation dem Urteil des Chirurgen, die Qualität der Spenderleber in Hinblick auf den individuellen Empfänger zu matchen. Organe, die sich im Vergleich zu Standardtransplantaten durch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schlechten Transplantatfunktion (10-30 % der Transplantate) oder gar ein Transplantatversagen (bis zu 5 %) (Busuttill, Klintmalm 2005) charakterisieren lassen und damit das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko für den Empfänger erhöhen, werden als marginal bezeichnet. Damit einhergehend werden je nach Zentrum bestimmte Extended Donor Criteria (ECD) beschrieben. Von der Bundesärztekammer wurden 2004 folgende Kriterien zur Evaluierung von Spenderlebern festgelegt: HBV oder HCV positiv, Sepsis mit positiver Blutkultur, Meningitis, extrahepatische Tumorerkrankung, Drogenabusus, Spenderalter > 65 Jahre, Fettleber >40 % (histologisch gesichert), Na >165mmol/ l (letzter Wert vor der Spendermeldung), Intensivstation einschließlich Beatmung des Spenders >7 Tage, Adipositas des Spenders mit BMI >30, Kaltischämiezeit >13 Stunden, GOT od. GPT >3x normal (letzter Wert vor der Spendermeldung), Bilirubin >3 mg/dl (letzter Wert vor der Spendermeldung) (Bundesärztekammer Bekanntmachungen: Richtlinien zur Organtransplantation 2004; Schemmer et al., 2007).

Dabei sind die Steatosis hepatis, das erhöhte Spenderalter sowie eine lange Kaltischämiezeit in der täglichen Routine der Transplantationschirurgie am häufigsten

anzutreffen. Abzugrenzen davon sind die absoluten Kontraindikationen einer Organspende, die in Tabelle 2 aufgeführt sind (Mieth et al., 2006).

Tabelle 2: Kontraindikationen für eine postmortale Leberspende

Absolut	Relativ
Melanomerkrankungen	Refraktäre Sepsis
Krebserkrankungen	Aktive immunologische Erkrankungen
Systemische Erkrankungen (z.B. MS)	HIV-Infektion
Akute Hepatitis B oder C Infektion	Tumormetastasen

Leberverfettung ist sowohl in Kadaver- als auch bei Lebendspendern keine Seltenheit (Halon et al., 2006). Die Inzidenz wird mit 9-26 % angegeben (D'Alessandro et al., 1991; Loinaz et al., 2000). Da hauptsächlich das Alter und der BMI einen wesentlichen Einfluss auf die Leberverfettung haben (Rinella et al., 2001), ist in den kommenden Jahren mit einem Anstieg der Prävalenz der Steatosis sowohl in postmortalen als auch in Lebendspenderlebern zu rechnen (Angele et al., 2008). Die schädigenden Auswirkungen der Leberverfettung auf die Transplantatfunktion werden in der Literatur sehr diskrepant bewertet. So konnte das vermehrte Auftreten eines primären Transplantatversagens und eine Verschlechterung des Organüberlebens mit der vorbestehenden Leberzellverfettung assoziiert werden (Marsman et al., 1996). Andere Untersucher kommen zu dem Ergebnis, dass sich moderat (30-60 %) verfettete transplantierte Lebern und selbst schwer (> 60 %) verfettete Transplantatlebern, wie schon zuvor für mild (< 30 %) verfettete Lebern gezeigt worden ist (Rossi et al., 2001), nicht signifikant nachteilig auf das Organ- und Patientenüberleben auswirken, vor allem wenn andere Risikofaktoren fehlen (Angele et al., 2008). Im Tierexperiment zeigte sich jedoch, dass verfettete Lebern viel empfindlicher gegenüber Schädigung durch warme (Caraceni et al., 1999) als auch durch kalte (Minor et al., 2000) Ischämie/Reperfusion waren.

Der demographische Wandel der Bevölkerung in Europa spiegelt sich auch in der Altersverteilung der verstorbenen Organspender wider. In den letzten Jahren hat sich der Anteil der verstorbenen Spender mit erhöhtem Lebensalter stetig erhöht, noch in 2004 waren ca. 32 % der Leichenleberspender über 55 Jahre alt, schon vier Jahre später waren es 39 % (Eurotransplant International Foundation: Annual Report 2008). Wie die Leberverfettung des Spenderorgans wird auch der Stellenwert des Spenderalters sehr unterschiedlich diskutiert. Obwohl keine hepatischen Funktionsstörungen mit einem erhöhten Lebensalter einhergehen, treten

physiologischerweise altersbedingte Veränderungen wie die Abnahme des Lebergewichtes und des –volumens als auch ein reduzierter Blutfluss auf (Wynne et al., 1989). Einerseits konnten ein signifikant schlechteres Organüberleben bei Spendern über 55 Jahre (Adam et al., 2000), bei Spender über 70 Jahre sogar ein schlechteres Patienten- und Organüberleben (Busquets et al., 2001) verifiziert werden. Dem gegenüber hatte das Lebensalter der Spender in anderen Studien keinen Einfluss auf das Organüberleben (Cescon et al., 2008). Dennoch kommt bei der Transplantation älterer Spenderlebern den anderen Risikofaktoren additiv oder gar potenzierend eine schwerwiegendere Bedeutung zu. Leberverfettung und eine verlängerte kalte Ischämiezeit können hier zu erhöhter Inzidenz an Organdysfunktion führen (De Carlis et al., 1999). Schwerstkranke Patienten profitieren ebenfalls nicht von der Lebertransplantation eines älteren Spenders (Cameron et al., 2006). Eine weitere kritische Patientengruppe bei der Transplantation einer Leber eines älteren Spenders sind Patienten mit einer HCV-Infektion-bedingten Leberzirrhose, die ein erhöhtes Risiko des Wiederauftretens der Infektion sowie ein reduziertes Transplantat- und Patientenüberleben aufweisen (Cameron et al., 2006; Mutimer et al., 2006).

Einer der Hauptgründe für eine initiale Organdysfunktion ist der erlittene Ischämieschaden. Eine verlängerte kalte Ischämiezeit stellt einen unabhängigen Risikofaktor für den Leberkonservierungsschaden dar (Briceno et al., 2002). Kaltischämiezeiten von 12 Stunden und mehr sind oft allein durch die logistischen Gegebenheiten der Organzuteilung unvermeidbar. Transplantate, die mit einer Kaltischämiezeit von > 14 Stunden verpflanzt werden, weisen einen verlängerten postoperativen Verlauf, vermehrtes Vorkommen von Gallenwegsstrikturen und ein vermindertes Transplantatüberleben auf (Piratvisuth et al. 1995). Das mittel- und langfristige Überleben verbessert sich signifikant bei einer Kaltischämiezeit von < 12 Stunden (Adam et al., 2000).

Nach den guten Resultaten in der Transplantation von Nieren nicht-herzschlagender Spender hat auch in der Lebertransplantation der steigende Anteil an Spenderlebern nichtherzschlagender Spender (NHBD) zur Erweiterung des Spenderpools beitragen können. So hat sich in den von Eurotransplant versorgten Ländern der Anteil der Lebern von nichtherzschlagenden Spendern von absolut 13 Organen in 2004 auf 46 in 2008 erhöht (Eurotransplant International Foundation: Annual Report 2008), in den USA fiel die Steigerung sogar noch deutlicher aus. Hier waren im Jahr 2000 39 und schon in 2006 277 Lebern von nichtherzschlagenden Spendern, was einen Anteil von 4,7 % an

allen durchgeführten Lebertransplantationen ausmacht, transplantiert worden (Freeman et al., 2008). Grundsätzlich muss bei der Organgewinnung von NHBD nach der Maastricht Klassifikation zwischen einem kontrollierten und einem unkontrollierten Modus unterschieden werden, wobei die Organe der ersteren Art weniger Schaden nehmen und größeres Erholungspotenzial besitzen als die der zweiten (Reich et al., 2000). Viele Studien zeigen das signifikant schlechtere Transplantat- und Patientenüberleben bei der Verwendung von Lebern aus nichtherzschlagenden Spendern (Abt et al., 2004). Trotz des höheren Risikos eines Transplantatversagens, von Merion et al. unter Einbeziehung weiterer Risikofaktoren sogar auf 85 % beziffert (Merion et al., 2006), und einer verzögerten Organfunktion wurden in anderen Studien akzeptable Langzeitergebnisse erreicht (Manzarbeitia et al., 2004). Bei NHBD spielt gerade die Dauer der Ischämiezeit eine zentrale Rolle für das langfristige Transplantatüberleben (Mateo et al., 2006).

Die Betrachtung der einzelnen Risikofaktoren eines Spenderorgans für das Transplantat- und Patientenüberleben bildet die heutige Situation in Transplantationschirurgie jedoch nur mehr unzureichend ab. Um dem Organmangel und der „unpassenden“ Verwendung von Transplantaten, die ggf. eine Retransplantation, mit wesentlich schlechteren Daten im Transplantat- und Patientenüberleben, erforderlich macht, erfolgreich zu begegnen, ist in den letzten Jahren dem gleichzeitigen Auftreten mehrerer Marginalitätskriterien sowie der Bedeutung einer individuelleren Spender-Empfänger-Selektion vermehrt Rechnung getragen worden. Berechnungsmodelle zur Bewertung von mehreren kombinierten Marginalitätskriterien wurden mit dem EDC Scoring System und dem Donor Risk Index (DRI) etabliert (Cameron et al., 2006; Feng et al., 2006). Feng et al. konnten zeigen, dass ein erhöhter DRI zu jedem Posttransplantationszeitpunkt mit einer reduzierten Transplantatüberlebensrate verbunden war (Feng et al., 2006). Risikofaktoren des Empfängers, die mit initial schlechter Leberfunktion assoziiert sind, umfassen einen hohen MELD-Score (Model of Endstage Liver Disease), ein erhöhtes Lebensalter, einen reduzierten medizinischen Status und den Umstand der Retransplantation. Diese Faktoren stellen zwar keine direkten Eigenschaften eines als marginal klassifizierten Organs dar, beeinflussen jedoch die Qualität der Spenderleber beträchtlich und können somit als Merkmale des Empfängers zur Generierung des Marginalstatus eines Organs im Empfängerorganismus beitragen. Der zunehmende Gebrauch von marginalen Spenderlebern wirft die Frage nach der Positionierung hinsichtlich deren Vergabepaxis

an Patienten mit hohem MELD-Score auf, deren Transplantationsdringlichkeit am höchsten einzustufen ist. Amin et al. fanden in ihrer Studie, die die Überlebensraten von Patienten auf der Warteliste mit der von Soforttransplantierten bei Verfügbarkeit eines Marginalorgans verglich, heraus, dass Patienten mit einem MELD-Score >20 einen 1-Jahres-Überlebensvorteil durch die Transplantation hatten (Amin et al., 2004). Die Ergebnisse einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2006, wonach das relative Risiko des Transplantatversagens einer marginalen Leber (DRI $>1,7$) nicht vom MELD-Score abhängt (Maluf et al., 2006), stellen dies und die Resultate von Schaubel et al. in Frage. Hier zeigte sich nämlich der Vorteil der Transplantation von Marginalorganen bei Wartelistenpatienten mit erhöhten Sterberisiko, wohingegen für Wartelistenpatienten mit niedrigem oder mittlerem Risiko, zu versterben, die Transplantation sowohl marginaler als auch risikoarmer Spenderlebern keinen Überlebensvorteil bedeutet (Schaubel et al., 2008). Dies bestätigen Feng et al. in ihrer Arbeit (Feng et al., 2006). Gängige Praxis besteht heute darin, dass Marginalorgane zumeist in Patienten mit niedrigem MELD-Score transplantiert werden.

Zur Vollständigkeit halber seien weitere Einflussgrößen auf die postoperative Leberfunktion wie die Dauer der warmen Ischämiezeit im Empfängerorganismus, perioperative technisch-chirurgische Komplikationen und der Einsatz von Blutprodukten erwähnt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zum optimalen Ergebnis einer Transplantation und zum sinnvollen Gebrauch von Marginalorganen die Risiken des Verbleibens auf der Warteliste, die des Spenders und die des Empfängers bedacht kalkuliert werden müssen. Die geeignete Verwendung von Marginalorganen in der Lebertransplantation stellt eine sichere Methode zur Erweiterung des Spenderpools und zur Reduktion der Wartelistensterblichkeit dar (Barshes et al., 2007). Da auch zukünftig dem kritischen Organmangel effizient zu begegnen ist, stellt die optimierte Verwendung und Konditionierung von Marginalorganen eines der Ziele in der Transplantationschirurgie dar. Neue Strategien der Organkonservierung, extrakorporale Organperfusion, Anwendung zellprotektiver Substanzen und die Entwicklung verlässlicher Parameter zur Vorhersage der postoperativen Transplantatfunktion können die Resultate in der Transplantation marginaler Lebern verbessern und sind deshalb unabdingbar, vielleicht auch zukünftig zur expandierten Nutzbarmachung von Marginalorganen beizutragen.

1.4 Die isolierte, extrakorporale Leberperfusion

Die Technik der isolierten extrakorporalen Leberperfusion dient, mit der Möglichkeit der exakten Definition und Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen, sowohl der Einschätzung der Organfunktion und der durch Ischämie/Reperfusion hervorgerufenen Organschädigung (Hellinger et al., 1997) ohne die Notwendigkeit der Durchführung einer kompletten Lebertransplantation. Desweiteren kann die Maschinenperfusion zur Organkonditionierung, z.B. nach warmer Ischämie (García-Valdecasas et al., 1998), zur dynamischen Konservierung im Rahmen von Transplantationen (Brettschneider et al., 1968) als auch bei ausreichend erhaltener Organvitalität zur Therapie des akuten Leberversagens als temporäres Leberersatzverfahren verwendet werden. Anhand der Bestimmung der Galleproduktion, der Transaminasenfreisetzung, der Evaluierung der metabolischen Funktionsparameter, der mikro- und makrozirkulatorischen Hämodynamik sowie des Sauerstoffverbrauches können verschiedenste pharmakologische Fragestellungen als auch viele Aufgabenstellungen auf dem Gebiet der Lebertransplantation beantwortet werden. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass trotz optimiert angepasster Versuchsbedingungen an die physiologischen Verhältnisse die Funktion der extrakorporal perfundierten Leber nicht der im Organismus entspricht (Mets et al., 1993).

Die Idee der extrakorporalen Perfusion im Sinne der experimentellen Forschung beruht auf der Disposition eines explantierten Organs in einem offenen oder geschlossenen artifiziellen Kreislauf. Dabei wird die Leber in einem Reservoir gelagert und, zumeist über Rollenpumpen, durch Konnektion ihrer Gefäßversorgung zur Perfusatlösung in Beziehung gesetzt. Durch Gestaltung der Versuchsrahmenbedingungen, bspw. der Zusammensetzung der Perfusionslösung, der Abwandlung der hämodynamischen Druck- und/oder Flusskonstanten, der Änderung in der Blutgaszufuhr und in der Temperierung sowie dem Zusatz von Versuchsstoffen bietet diese Methode unter Reduzierung unerwünschter Einflussfaktoren eine relativ einfache Handhabung. Das Verfahren, das 1942 als Technik zur Beurteilung des Leberzellmetabolismus im isolierten Rattenlebermodell Anwendung fand (Trowell 1942), ist seit langem bekannt. Limitierender Faktor für die Perfundierbarkeit von Leber der Großtiere war die Zeit. So konnten Schweinelebern initial nur wenige Stunden (Abouna et al., 1973) perfundiert werden, was später durch technische Adaptationen der Perfusionsapparatur und durch Innovationen auch bis zu 24 Stunden bei nahezu allen Großtierlebern möglich war (Neuhaus, Blumhardt 1993). Bei Hundelebern konnte die Konservierung mithilfe der

kontinuierlichen Perfusion im hypothermen isolierten Perfusionskreislauf sogar auf 72 Stunden, mit anschließender erfolgreicher Transplantation, ausgedehnt werden (Pienaar et al., 1990).

Ziel der Organkonservierung mit Konservierungslösungen ist der optimale Erhalt der Organfunktion durch Schutz zellulärer Vitalität unter Ischämiebedingungen. Der Einsatz der extrakorporalen Perfusion zum Zwecke der Organkonservierung und -konditionierung, der mehr logistischen Aufwand und höhere Kosten erfordert, muss gerade im Hinblick auf die expandierende Nutzung von Marginalorganen, bspw. bei Organen aus nicht-herzschlagenden Spendern mit starker ischämischer Schädigung kritisch diskutiert werden (Schön et al., 1998). Das Prinzip der Maschinenperfusion als Methode der Organkonservierung wurde initial von Belzer beschrieben (Belzer et al., 1970). Weiterführende Arbeiten zeigten, dass sich die Funktion ischämisch alterierter Lebern nach 24 Stunden normothermer Perfusion im Gegensatz zur Kaltkonservierung in UW-Lösung regenerieren konnte (St Peter et al., 2002). Dies ist gerade im Hinblick auf die kurze sichere Warmischämietoleranz der humanen Leber von Bedeutung (Huguet et al. 1978). Jedoch scheiterte die extrakorporale normotherme Maschinenperfusion, Schweinelebern nach einer Stunde Warmischämie- und einer oder vier Stunden Kaltischämiezeit am Leben zu erhalten, wie Reddy und Mitarbeiter in ihren Studien belegen konnten (Reddy et al., 2004; 2005). In der Ausweitung der maximal möglichen Konservierungszeit vor einer geplanten Transplantation und in der Konditionierung von Marginalorganen, wo Konservierungslösungen schnell an ihre Grenzen stoßen, könnten dennoch Vorteile der dynamischen Methode der extrakorporalen Perfusion gegenüber der Lagerung in einer Konservierungslösung liegen. Die Rolle der Mikrozirkulation und deren Verständnis bei I/R-Schädigung von Transplantaten offenbaren wesentliche Vorzüge der kontinuierlichen Perfusion des Transplantatorgans gegenüber der Kaltkonservierung in Konservierungslösungen. Durch Vasokonstriktion bei Hypothermie erreicht die Konservierungslösung viele Organabschnitte nicht, so dass unweigerlich eine gestörte Mikrozirkulation bei der Reperfusion resultiert. Eine erfolgreiche Perfusion unbeeinträchtigter Schweinelebern gelang über 72 Stunden (Butler et al., 2002). Schweinelebern, die im extrakorporalen Kreislauf normotherm perfundiert werden, sind kalt konservierten Lebern im Transplantationsmodell überlegen (Schön et al., 2001). Als Therapieoption im klinischen Kontext bei akutem Leberversagen wurden weder im homologen Modell mit humanen Lebern (Lie 1981) noch in heterologen Konzepten unter Einsatz von Lebern unterschiedlicher Großtierspezies (Lie 1981; Winch 1971)

zufriedenstellende Resultate erzielt. Durch Anlage eines veno-venösen Bypasses wurde das Patientenblut dem extrakorporalen Organ zugeführt. Erstmals setzten Sen et al. in Indien bei fünf Patienten und Eiseman et al. in den USA bei acht Patienten mit akutem Leberversagen die extrakorporale Maschinenperfusion ein (Sen et al., 1966, Eiseman et al., 1965). Im ersten Fall wurde das allogene Verfahren mit humanen Lebern etabliert, im zweiten das xenogene unter Verwendung von Schweinelebern. Entgegen früheren Annahmen übertrifft der Erfolg der extrakorporalen Perfusion mit Schweinelebern in der Behandlung des akuten Leberversagens die konventionelle intensivmedizinische Behandlung nicht, die extrakorporale Perfusion mit nichttransplantablen menschlichen Lebern als temporäres Unterstützungssystem könnte jedoch von praktikablem Nutzen sein (Pascher et al., 2002).

2 ABLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Der zytoprotektive Effekt von Prostazyklinanaloga zum Schutz vor Ischämie/Reperfusionsschädigung wie die effektive Therapie des primären Organversagens bzw. der initial beeinträchtigten Organfunktion durch Einsatz von Prostaglandinen lassen sich anhand vieler klinischer Studien eindrucksvoll belegen. Eine systematische Untersuchung der Spenderbehandlung, der Modifizierung der Konservierungslösung und der Empfängerbehandlung sind bisherige Protokolle allerdings schuldig geblieben. Dabei ist die Konditionierung der Leberfunktion nach einer längeren Ischämiezeit, gerade bei zunehmender Verwendung von Marginalorganen, von zentraler Bedeutung. Um postoperative Komplikationen möglichst kalkulierbar und so gering wie möglich zu gestalten, spielen neben hoher chirurgischer Arbeitsqualität und kurzen Ischämiezeiten vermehrt der Einsatz von Testsubstanzen wie z.B. Prostaglandine und die normotherme extrakorporale Leberperfusion zur Optimierung der Transplantatfunktion eine Rolle.

2.1 Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte der Vergleich zwischen zu verschiedenen Zeitpunkten verabreichten Prostazyklintherapieregimen durchgeführt werden, und anhand der Auswertung von Funktion- und Schädigung am Schweinelebermodell der Nachweis des optimalen Behandlungskonzeptes erbracht werden.

Folgende Fragestellungen galt es zu beantworten:

- ob die Spendervorbehandlung, die Modifizierung der Konservierungslösung oder die Reperfusatbehandlung den günstigsten Effekt auf die Funktions- bzw. Schädigungsparameter hat
- ob der Effekt der Iloprostgaben in den verschiedenen Behandlungsgruppen, untersucht im Rahmen der extrakorporalen Reperfusionszeit von acht Stunden, nachhaltig oder temporär war
- ob Iloprost mit seinem spezifischen Wirkprofil auf bestimmte Leberfunktionen und Schädigungsmuster, hervorgerufen durch 20 Stunden kalte Ischämie, einen vorzugsweisen Effekt zeigt
- ob die gemessenen Schädigungs- und Funktionsparameter geeignet sind, eine Gruppenunterscheidung hinsichtlich der Über- oder Unterlegenheit eines Iloprost-Therapieregimes zu gewährleisten
- ob das sich im Experiment überlegen zeigende Behandlungsregime im klinischen

Alltag der Transplantationschirurgie sinnvoll und praktikabel anzuwenden ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Die Leberexplantation

Als Organspender dienten zehn bis 16 Wochen alte, antibiotikafrei ernährte Läufer Schweine der deutschen Landrasse mit einem Gewicht zwischen 22 bis 26 kg (Mittelwert: $23,7 \pm 1,56$ kg) aus der Landwirtschaft Sommerfeld Bandenburg, Seddiner See. Diese wurden bis zu zwölf Stunden vor der OP unter normaler Nahrungszufuhr gehalten, dann unter Nahrungskarenz mit freiem Zugang zu Wasser gestellt. Zur Operation wurden die Schweine wie folgt prämediziert. Zur Sedierung wurden 4-6 mg Azaperon (Stresnil, Fa. Janssen) per kg Körpergewicht i. m., 10 mg Ketamin (Ursostamin, Fa. Serumwerk Bernburg AG) per kg Körpergewicht und 0,05 mg Atropin per kg Körpergewicht i.m. in der Mischspritze verabreicht. Die Tiere wurden in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert. Vor der orotrachealen Intubation wurde die Narkoseeinleitung mit 0,25-0,5 mg Etomidat (Etomidat Lipuro, Fa. B. Braun, Melsungen) i.v. durchgeführt. Nach Überprüfung des Wachheitsgrades erfolgte die Intubation mit Hilfe eines speziellen Laryngoskops. Zur Inhalationsnarkose wurde ein Gasgemisch aus 40 % O₂, 60 % N₂O und 1,5-1,8 % Isofluran über den Ventillog Capnolog Sulla 800 V (Drägerwerk Lübeck) inklusive Schlauchsystem vom Drägerwerk Lübeck verwendet. Nach der Intubation wurden 4 mg Pancuroniumbromid i.v. appliziert, bei Bedarf wurde die Gabe von 2-4 mg Pancuroniumbromid i.v. zur Relaxationsverbesserung wiederholt. Während der Operation wurde die Beatmung mit einem Atemzugvolumen von 100-150 ml/kg Körpergewicht, einem angestrebten EtCO₂ von 32-36 mmHg und einem Beatmungsdruck von $\leq 20-25$ cm H₂O mit dem Siemens Ventilator 711 durchgeführt. Zur Überwachung des endexpiratorischen Volumens, des Beatmungsdrucks sowie der Sauerstoffkonzentration verwendeten wir das Gerät Flowmeter Unit 770 der Firma Siemens. Der intraoperativen Überwachung der Blutgaspartialdrücke sowie der arteriellen Drücke dienten Intensivüberwachungsgeräte der Drägerwerke AG Lübeck.

Ein Urindauerkatheter wurde nach der Narkoseeinleitung gelegt. Nach erfolgter Narkotisierung begann die Operation der Versuchstiere unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurden die Arteria carotis communis und die Vena jugularis jeweils einer Seite für die spätere Entblutung präpariert und mit einem Kunststoffschlauch (Heidelberger Verlängerung der Fa. B. Braun, Melsungen) kanüliert. Die Kanülierung der Arteria carotis externa erfolgte zur intraoperativen Blutgasanalyse und zur

Blutdruckmessung. Nach erfolgter medianer Laparotomie wurde zunächst der Ductus cysticus aufgesucht und ligiert. Zur Messung der intraoperativ und später in der Reperfusion produzierten Galle wurde der Ductus choledochus mit einer Heidelberger Verlängerung (Fa. B. Braun, Melsungen) kanüliert und nachfolgend distal ligiert. Die intraoperativ aufgefangene Galle wurde einem Sammelgefäß zugeführt. Anschließend erfolgte das Aufsuchen und Freilegen der distalen Aorta abdominalis und der Vena cava inferior kurz proximal dem Abgang der Iliakalgefäße. Die proximale Aorta abdominalis wurde in Höhe des Hiatus aorticus ebenfalls aufgesucht und freipräpariert. Unter Perforation des Zwerchfells erfolgte die Ligatur des Gefäßes unmittelbar vor dem Start der Kaltperfusion. Parallel hierzu wurde die Entblutung des Schweins aus der Arteria carotis communis und der Vena jugularis interna mit der Gabe von 10.000 IE Heparin in die Arteria carotis communis eingeleitet. Während der Entblutungszeit wurde die distal präparierte Vena cava inferior ligiert. Die distale Aorta abdominalis wurde unterbunden, unmittelbar proximal davon durchtrennt und an das luftleere Infusionssystem angeschlossen. Dann wurde die Kaltperfusion mit 1000 ml 4 °C kalter HTK-Lösung (Custodiol™, Dr. Koehler Chemie, Alsbach-Haehnlein, Germany) über die distale Aorta retrograd gestartet. Neben der Leber wurden auch alle anderen Bauchorgane mit der Konservierungslösung perfundiert. Zeitgleich zur HTK-Perfusion wurden alle intraabdominal liegenden Organe mit 2.000 ml 4 °C kalter Kochsalzlösung von extern gekühlt. Nach der ca. dreiminütigen kalten Perfusion mit der HTK-Lösung (Custodiol™, Dr. Koehler Chemie, Alsbach-Haehnlein, Deutschland) wurde die Vena cava inferior eröffnet und von distal bis zu den Abgängen der Nierenvenen präpariert. Die Vena portae, die Arteria gastroduodenalis und die Vena lienalis wurden entlang des oberen Randes des Pankreas dargestellt und in ausreichendem Abstand zur Leber abgesetzt. Anschließend erfolgte die Präparierung der Aorta abdominalis von der Bifurkation der Iliakalgefäße nach proximal bis zum Abgang der Nierenarterien und vom Hiatus aorticus nach distal bis zum Truncus coeliacus. Die Arteria hepatica communis wurde dargestellt und unmittelbar distal des Abgangs vom Truncus coeliacus leberfern abgesetzt. Bei der gesamten Gefäßpräparation wurde auf schonende Technik ohne Gefäßklemmen Wert gelegt, um mögliche Intimaschäden mit nachfolgenden Durchblutungskomplikationen zu minimieren. Nach Durchtrennung der Haltetligamente wurde die Leber entnommen. Das isolierte Organ wurde anschließend mit der Waage der Firma Sartorius (Inventarnummer 146471, geeicht bis 2004) gewogen und in einem geschlossenen Gefäß in zwei Litern 4 °C kalter, die Leber

allseits umgebener HTK-Lösung auf Eis gelagert. Es erfolgten eine Gewebeprobenentnahme, die Dokumentation der makroskopischen Lebermorphologie und Konsistenz, die Erfassung der intraoperativ produzierten Galleflüssigkeit und die Kanülierung der Vena portae sowie der Arteria hepatica communis mit sterilen Konnektoren zwischen 2 und 6 mm Durchmesser (Fa. Jostra, Hirrlingen). Die Operation nebst sämtlichen Vor- und Nachbereitungen für die nachfolgende Reperfusion erfolgte unter sterilen Bedingungen und dauerten etwa eine Stunde. Nach der Explantation wurde die Leber einer 20stündigen Kaltischämie in zwei Litern HTK bei 4 °C in einem geschlossenen Gefäß ausgesetzt.



Abbildung 3: Explantierte Schweineleber unmittelbar vor Beginn der 20stündigen Kaltischämie in HTK, oben rechts kanülierte Galleableitung

Die Ischämietoleranz der Leber in HTK beträgt nach der Literatur zehn bis zwölf Stunden (Feng et al., 2006; Pokorny et al., 2004). Die HTK-Lösung zur Konservierung von Organtransplantaten und zur Organprotektion bei Eingriffen in Blutleere besteht im Wesentlichen aus einem Elektrolytgemisch, einem organischen Puffer Histidinhydrochlorid/Histidin, der essentiellen Aminosäure Tryptophan sowie Mannitol. Die Gesamtosmolarität der Lösung liegt geringfügig über der normalen Plasmaosmolarität. Tabelle 3 zeigt die genaue Zusammensetzung der HTK-Lösung.

Bestandteil	Konzentration in mmol/l
NaCl	15
KCl	9,0
MgCl ₂ -Hexahydrat	4,0
Histidinhydrochlorid-Monohydrat	18

Histidin	180
Tryptophan	2,0
Mannitol	30
CaCl ₂ ×2 H ₂ O	0,015
Kaliumhydrogen-2/oxopentandioat	1,0

Tabelle 3: Zusammensetzung der HTK-Konservierungslösung

3.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe 1 (Kontrollgruppe): n=7 Lebern wurden nach 20stündiger kalter Ischämie in zwei Litern HTK-Lösung normotherm acht Stunden im geschlossenen extrakorporalen Kreislauf rezirkulierend perfundiert.

Gruppe 2 (Perfusion mit Spendervorbehandlung): n=7 Lebern wurden intraoperativ mit 1µg Iloprost/ kg KG als intraaortale Bolusinjektion ca. zwei Minuten vor dem Start der retrograden Kaltperfusion mit HTK vorbehandelt. Nach 20stündiger kalter Ischämie in zwei Litern HTK-Lösung wurden die Lebern der Gruppe 2 acht Stunden normotherm im geschlossener extrakorporalen Kreislauf rezirkulierend perfundiert.

Gruppe 3 (Perfusion mit Modifizierung der Konservierungslösung): n=7 Lebern wurden nach 20stündiger kalter Ischämie in zwei Litern HTK + 25 µg Iloprost = (0.0125µg/ml) acht Stunden normotherm im geschlossenen extrakorporalen Kreislauf rezirkulierend perfundiert.

Gruppe 4 (Perfusion mit Modifizierung der Reperfusionslösung): n=7 Lebern wurden nach 20stündiger Kaltischämie in zwei Litern HTK-Lösung acht Stunden normotherm im geschlossenen extrakorporalen Kreislauf rezirkulierend perfundiert, dabei wurde dem Perfusionsmedium Iloprost in einer Dosierung von 0,0021µg/kg/min kontinuierlich via Perfusor hinzugesetzt.

Gruppe	Anzahl (n)	Gewicht (g)	Ischämiezeit (h)	Perfusionszeit (h)	Iloprostbehandlung
1	7	604±77	20	8	nein
2	7	594±85	20	8	Spender
3	7	602±132	20	8	HTK-Lösung
4	7	584±67	20	8	Reperfusion

Tabelle 4: Einteilung der Versuchsgruppen

3.3 Das Perfusionsmodell

Die extrakorporale Perfusion erfolgte in einer Apparatur aus zwei Rollerpumpen (Fa. Stöckert, München) analog denen einer Herz-Lungenmaschine. Die Begasung des

Perfusats mit Sauerstoff wurde über einen Membranoxygenator (Polystan Safe Mini Pediatrics) mit einem regulierbaren Blutflussvolumen von 300 - 2300 ml/min gewährleistet. Weitere Bestandteile des Kreislaufs waren ein Wärmetauscher mit Reservoirfunktion (Cobe CML 50 - 101, Fa. Cobe), ein Silikoschlauchsystem (Silicon-Tubing, Aromado Medizin Technik, Düsseldorf), ein Reservoirgefäß zur Organlagerung sowie ein Druckmesssystem (M 808, Fa. Lohmeier, München) mit elektromagnetischem Flussmesskopf (Cliniflow II, Fa. Carolina Medical Electrics, King, USA), Luer-Konnektor (Fa. Jostra, Hirrlingen) und Druckwandler (Transpac IV, Abott Laboratories, Morgan-Hill, USA), das in den Silikonschlauch eingesetzt wurde.

3.3.1 Der Perfusionskreislauf

Die Perfusion der Vena portae erfolgte passiv druckkontrolliert aus dem gleichzeitig als Reservoir dienenden Wärmeaustauscher. Dabei bestimmte die Höhe der Flüssigkeitssäule im Wärmetauscher direkt über dem Leberhilus den hydrostatischen Druck, der als portalvenöser Druck ca. 25 cm Wassersäule betrug. Die druckkontrollierte Perfusion der Arteria hepatica communis erfolgte aus dem Reservoir über eine Rollerpumpe (Pumpe 2) mit nachfolgender Oxygenierung im Membranoxygenator mit einem Mitteldruck von ca. 60 mmHg, welcher vor Erreichen der Leber mittels eines Drucksensors ermittelt wurde. Die von den Pumpen erzeugte Perfusion der Arteria hepatica zeigte eine pulsatile Flusskurve. Das Lagerungsgefäß für die im Perfusat frei schwimmende Leber diente gleichzeitig als Auffanggefäß für den passiven Abfluss aus den Venae hepaticae. Mittels einer weiteren Rollerpumpe (Pumpe 1) wurde das Perfusat des Auffanggefäßes zum Reservoirbehälter des Wärmeaustauschers befördert. Der Perfusatspiegel im Reservoirbehälter wurde über die Regulation der Pumpe 1 konstant bei 25 cm Wassersäule über Leberniveau gehalten, unabhängig von portaler und arterieller Perfusion. Somit entsprach die Flussrate dieser Pumpe 1 dem Gesamtfluss der Leber. Die Oxygenierung über den Membranoxygenator wurde mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) realisiert. Die Temperatur der Perfusats betrug während der gesamten Perfusion 37 °C und wurde vom Wärmeaustauscher automatisch reguliert.

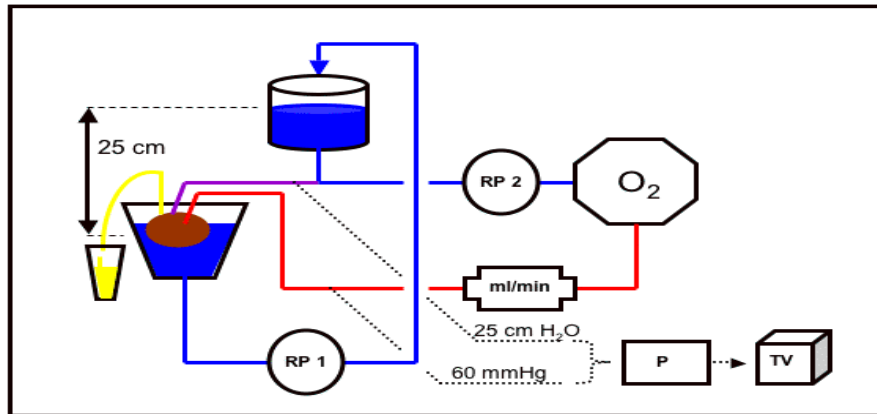


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Extrakorporalen Perfusionssystems. Abkürzungen: RP 1: Rollerpumpe 1 führt das gesamte, durch die Leber geflossene Perfusionsmedium dem Reservoir zurück. RP 2: Rollerpumpe 2, führt einen Teil des Reservoirvolumens dem Oxygenator bzw. der Flussmessung und dem arteriellen Stromgebiet der perfundierten Leber zu. ml/min: Flussmessung. P: Druckaufnehmer. O₂: Oxygenator.

3.3.2 Das Perfusat

Als Perfusat dienten je zwei Liter voll heparinisiertes, allogenes Schweineblut, 1,5 Liter Basis- und Elektrolytlösung zur Hämofiltration (SH-BIC 35®/SH-EL 02®, B. Braun, Melsungen) sowie 500 ml 6%ige HAES-Lösung (Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg). Die gebrauchsfertige Hämofiltrations-Basislösung SH-BIC 35 enthält:

Komponente	Konzentration in mmol/ l
Na ⁺	140
K ⁺	2,0
Ca ²⁺	1,5
Mg ²⁺	0,5
Cl ⁻	111
HCO ³⁻	35
wasserfreie Glukose	5,5
theoretische Osmolalität in mOsm/l	296
pH	7,2-7,5

Tabelle 5: Zusammensetzung der Hämofiltrations-Basislösung SH-BIC 35

Die Elektrolytlösung zur Bicarbonat- Hämofiltration SH-EL 02 setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Konzentration in mmol/l
Na+	72
K+	18
Ca ²⁺	13,5
Mg ²⁺	4,5
Cl-	153
theoretische Osmolalität	311 mOsm/l

Tabelle 6: Zusammensetzung der Elektrolytlösung SH-EL 02 zur Bicarbonat-Hämofiltration

Vor Reperfusionbeginn wurde die Zirkulation im Perfusionskreislauf mit sämtlichen Komponenten des Perfusats gestartet. Zunächst wurde die Hämofiltrationslösung in die Apparatur gefüllt und mit 10.000 IE Heparin und 40 mg Tobramycin (Fa. Cell Pharm) versetzt, dann wurde das frische Schweineblut hinzugefügt, und die Zirkulation mit Oxygenierung und Erwärmung wurde gestartet. Insgesamt zirkulierten vier Liter Perfusatflüssigkeit mit einem Hämatokrit von ca. 22-25 % und einem ungefähren Hb von 7 mg/dl. Nach vier Stunden Perfusionszeit wurden dem Perfusat erneut 40 mg Tobramycin (Fa. Cell Pharm) und 10.000 IE Heparin zugesetzt.

3.3.3 Die Organperfusion

Nach einer 20stündigen Kaltischämiezeit bei 4 °C in HTK-Lösung wurde die Leber zunächst mit 1,5 Litern 4 °C plasmaitoner Elektrolytlösung (Basis- und Elektrolytlösung, SH-BIC35®/SH-EL02®, B. Braun, Melsungen) geflusht. Das Effluat wurde aufgefangen. Dann wurde die Leber in das mit 37 °C warmer Perfusionslösung gefüllte Auffanggefäß gelegt. Die Konnektion der Vena portae und der Arteria hepatica an den Perfusionskreislauf erfolgte nach Entlüftung der Gefäße durch Füllen der Kanülen mit dem Perfusat. Die extrakorporale Perfusion über acht Stunden wurde mit dem Anschluss an das Schlauchsystem gestartet. Dabei machte der portalvenöse Fluss ca. 2/3 des Gesamtflusses mit einem Druck von 25 cm Wassersäule für die portalvenöse Perfusion aus. Der restliche Anteil fiel der mit 60-80 mmHg druckregulierten arteriellen Perfusion zu, so dass ein Gesamtperfusatfluss von etwa 2-3 ml/g Lebergewicht/min erreicht wurde.

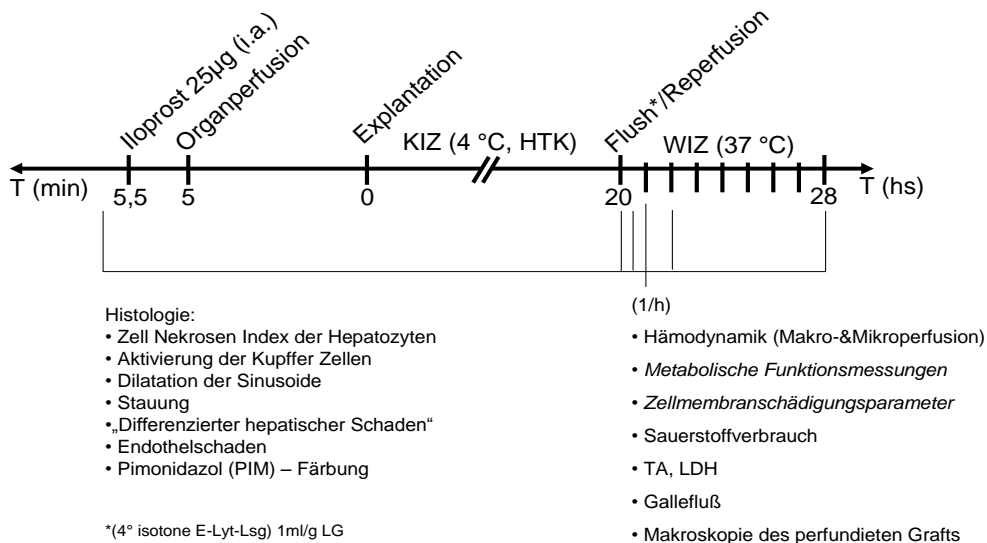


Abbildung 5: Zeitliches Schema des Versuchsablaufs

3.4 Das Untersuchungsprogramm

3.4.1 Überblick des Untersuchungsrepertoires in den Perfusionsgruppen

Die Lebermorphologie wurde makroskopisch zu bestimmten Untersuchungszeitpunkten beurteilt. Das Lebergewicht wurde nach der Explantation und am Ende der Reperfusion evaluiert. Dem Perfusat und allen vier Untersuchungsgruppen wurden Proben zur Bestimmung biochemischer Parameter, in Tabelle 7 zusammengestellt, als auch Parameter der Blutgasanalyse gemäß Tabelle 8 entnommen. Dokumentiert wurden zudem die Menge der während der Perfusion produzierten Galle, die Makrohämodynamik sowie die Mikrozirkulation. Der Perfusatfluss pro Gramm Lebergewicht mit jeweiligem arteriellem und portalvenösem Anteil, die Widerstände im arteriellen als auch im portalen Stromgebiet wurden erfasst. Der Sauerstoffverbrauch wurde berechnet. Die Messung der Mikrozirkulation beinhaltete insbesondere die Bestimmung des tiefen Flusses. Es erfolgte die molekularbiologische Analytik von TNF- α , RsNO und MPO aus dem rezirkulierenden Perfusat zu ausgewählten Zeitpunkten.

3.4.2 Biochemische Parameter

Zur halben, zweiten, vierten, sechsten und achten Stunde nach Start der Reperfusion wurden Proben zur Bestimmung der folgenden Parameter entnommen:

Stoffwechselfparameter: Glucose, Harnstoff
--

Tabelle 7: Biochemische Untersuchungsparameter

Diese Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Charité, Standort CVK an dem Gerät Modular der Firma Roche, Mannheim.

3.4.3 Blutgasanalyse

Zusammen mit der Probenentnahme für die biochemischen Parameter zur halben, zweiten, vierten, sechsten und achten Stunde erfolgte auch die Bestimmung der Blutgase. Zur Einschätzung und Berechnung des Sauerstoffverbrauches wurden jeweils Proben aus den arteriellen und portalvenösen Zuflüssen vor der Leberpassage und aus den Lebervenen nach Leberdurchfluss entnommen. Folgende Parameter wurden dabei bestimmt:

BGA arteriell, portalvenös, venös: pH-Wert, O ₂ - und CO ₂ -Partialdruck, Bicarbonat, O ₂ -Sättigung

Tabelle 8: BGA-Untersuchungsparameter

Ein OSM 3 Hemoximeter, Radiometer, Kopenhagen diente dabei als Analyseapparatur.

3.4.4 Bilanzierung der Galleproduktion

Die während der Reperfusion gebildete Galle wurde aus dem Ductus hepatis communis separiert einem offenen Sammelgefäß zugeführt und pro Minute pro g Lebergewicht bilanziert.

3.4.5 Makroskopische Beurteilung der Lebern

Parallel zu den Probenentnahmen für die Labor- und BGA-Analytik erfolgte eine makroskopische Gesamtbeurteilung der Leber durch die Untersucher. Gemäß der unten aufgeführten semiquantitativen Score (Tabelle 9) wurden der Qualität von Farbe, Konsistenz, Perfusion verschiedene Punkteränge von 1 bis 4 zugeordnet. Der Gesamtscorewert ergab sich durch Addition aller Punkteränge, so dass die Qualität des Organs zur nullten, zweiten, vierten, sechsten und achten Stunde der Reperfusion klassifiziert werden konnte (Tabelle 10).

Bewertungskriterium		Punktwert
Farbe	homogen rosig	1
	< 25 % fleckig	2
	25 - 50 % fleckig	3
	> 50 % fleckig	4
Konsistenz	weich	1
	partiell induriert	2
	induriert	3
	hart	4
Perfusion	homogen	1
	< 25 % inhomogen	2
	25 - 50 % inhomogen	3
	> 50 % inhomogen	4

Tabelle 9: Bewertungskriterien Makroskopie-Score

Gesamtpunktwert	Beurteilung
10-12	stark marginale Organmorphologie und -funktion
7-9	marginale Organmorphologie und -funktion
4-6	leicht reduzierte Organmorphologie und -funktion
< 4	geringgradig alterierte Organmorphologie und -funktion

Tabelle 10: Auswertung Makroskopie-Score

3.4.6 Messung der Gewichtsdiﬀerenz

Die Leber wurde initial einmal direkt nach Explantation und direkt nach der achtstündigen Reperfusion mit einer digitalen Waage gewogen. Die Gewichtsdiﬀerenz Δm wurde als Ergebnis der Gleichung $m_{\text{postperfusionem}} - m_{\text{posttransplantatinem}}$ in prozentualem Relativwert zum Ausgangsgewicht angegeben.

3.4.7 Messung der Makrohämodynamik

In den arteriellen Schenkel des Perfusatkreislaufs wurde in den das oxygenierte Perfusat führenden Teil des Silikonschlauchsystems ein elektromagnetischer Flussmesskopf (Cliniflow II, Fa. Carolina Medical Electronics, King, USA) sowie ein Luer-Konnektor (Fa. Jostra, Hirrlingen) zum Anschluss eines Druckwandlers (Transpac IV, Abbott Laboratories, Morgan-Hill, USA) zur Druckmessung (M 808, FA. Lohmeier, München) eingesetzt. Der Abstand zwischen beiden Messpunkten betrug 2 cm. Die Frequenzantwort des Flussmesskopfes war bis zu einer Frequenz von 25 Hz niedrig und wies nach

Herstellerangaben eine Phasenverschiebung von 3° auf. Die Dämpfungsfrequenz des Drucksystems betrug 15 Hz (Herstellerangaben). Die Messdaten wurden mit Hilfe einer AD-Karte (DAS-16, Fa. ComputerBoards, Middleboro, USA) mit einer Abtastrate von 100 Hz aufgenommen und auf einem Notebook-Computer (Satellite Pro 420, Toshiba) gespeichert. Nach Erreichen von Steady-State-Bedingungen wurden jeweils 3 Messreihen von insgesamt 20 s Dauer zu den Messzeitpunkten zur halben, zweiten, vierten, sechsten und achten Stunde aufgezeichnet.

3.4.8 Messung der Mikrozirkulation

Die Ermittlung des tiefen Gewebeflusses mittels Laser-Doppler-Spektroskopie mit dem Depthselective I der Fa. LEA Medizintechnik GmbH, Gießen. Hierzu wurden mit einer Flachsonde, die der perfundierten Leberoberfläche direkt aufgelegt wurde, die Flussparameter in einer Tiefe von 8 mm über einen Monitor nach Erreichen von Steady-State-Bedingungen für ca. 20 Sekunden registriert. Messzeitpunkte waren zur halben, vierten und achten Stunde nach Reperfusionbeginn.

3.4.9 Molekularbiologische Analysen

Zu drei Zeitpunkten, nach einer halben, vier und acht Stunden nach Beginn der Reperfusion wurden dem zirkulierenden Perfusat Proben für die Bestimmung von TNF- α und Stickstoffmonoxid RsNO entnommen. Die Bestimmung der Myeloperoxidase MPO erfolgte unmittelbar postoperativ nach der Explantation und am Ende der Reperfusion.

Zur Weiterverarbeitung erfolgte zunächst die Trennung von Serum und plasmazellulären Bestandteilen durch Zentrifugieren der Proben unmittelbar nach Entnahme mit der Zentrifuge Hettich Rotixa/RP der Fa. Hettich Zentrifugen, Deutschland, bei 20.000 r/min für fünf Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -20 °C asserviert. Der Rest wurde verworfen.

Für die Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) wurden ca. 100-150 mg schwere Lebergewebeproben unmittelbar postoperativ und nach acht Stunden der Reperfusion, die keilförmig exzidiert und sofort nach Gewinnung in flüssigem Stickstoff und nachfolgend bei -20 °C kryokonserviert wurden, verwendet.

3.4.9.1 Bestimmung von RsNO (Nitroso-Thiole)

Ein großer Nachteil der Methode nach „Griess“ zur indirekten Bestimmung von NO ist die große Störanfälligkeit. Besonders in biologischen Proben kommt es zu Interaktionen

zwischen den SH-Gruppen und dem Griess-Assay (Tsikas et al., 1997). Die Sensitivität des Griess-Assays kann durch eine Abwandlung erhöht werden, hierzu erfolgte der Nachweis der Nitroso-Thiole nach der Methode nach Griess.

Alle Reagenzien wurden auf Eis deponiert. Vorbereitend mussten zunächst verschiedene Nachweislösungen bei Raumtemperatur angesetzt werden.

Lösung A: Natriumnitrit 14,5 mM

10 mg NaNO₂ + 10 ml H₂O

= 14,5 mM

daraus: 100 µl + 9,9 ml H₂O = 145 mM

Lösung B: Ammoniumsulfat 0,005 %

Stock: 10 mg + 10 ml H₂O = mg/ml

daraus: 1 ml + 19 ml H₂O = 1 mg/20 ml

Lösung C: HgCl₂/Sulfaguanidin

HgCl₂ 0,062 % = 2,22 mM

5 mg + 8 ml H₂O

Sulfaguanidin 0,32 % = 15 mM

100 mg + 32 ml 1N HCl

1 Teil HgCl₂ + 4 Teile Sulfaguanidin

Lösung D: N-Naphtylathylendiamin 0,01 %

2 mg + 20 ml H₂O

Standard: L-Cystein

9,7 mg + 10 ml 1N HCl

verdünnen 1:200

50 µl + 10 ml HCl = 40 µM

weiter mit HCl verdünnen 1:2, also 20-10-5-2,5-1,25 bis 0,63 µM

Nun erfolgte das Ansetzen für Leerwert, Standard und Proben nach folgendem Schema:

Leerwert	Standard	Probe
200 µl HCl	200 µl Standard	100 µl H ₂ O
200 µl Lsg. A	200 µl Lsg. A	100 µl Probe

mischen, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen

200 µl Lsg. B 200 µl Lsg. B 100 µl Lsg. B

mischen, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen

200 µl Lsg. C 200 µl Lsg. C 100 µl Lsg. C

mischen, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen

200 µl Lsg. D 200 µl Lsg. D 100 µl Lsg. D

mischen

Nach 10 Minuten sind jeweils 300 µl in die Mikrotiterplatte zu geben.

Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte bei 550 nm gegen den Leerwert im Photometer Fluostar Galaxy der Fa. BMG LabTechnologies, Offenburg, Deutschland. Die Erstellung der Auswertungsgraphen und Ermittlung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit der Software der selbigen Firma.

3.4.9.2 Bestimmung von TNF- α

Der qualitative und quantitative Nachweis von TNF- α wurde mit dem Quantikine® Porcine TNF- α /TNF SF2 Immunoassay der Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland durchgeführt. Dieser stellte einen 4,5 Stunden-Feste-Phase-ELISA dar, der sich der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik bediente. Die EDTA-haltigen Ausgangsproben wurden zunächst für 20 Minuten bei 1000 x g in der Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland zentrifugiert. Die Kontrolle des Kits wurde mit 1,0 ml destilliertem Wasser wiederhergestellt, die Kontrolle wurde unverdünnt untersucht. Zur Herstellung des TNF- α -Konjugates wurden dem 0,5 ml Konjugatkonzentrat in einem sterilen lichtundurchlässigen Behälter 11,0 ml Konjugatverdünnung zugesetzt. Zum Ansetzen von 625 ml Waschpuffer wurden 25 ml des nicht-auskristallisiertes Waschpufferkonzentrats in 600 ml destilliertes Wasser gegeben. Die Herstellung des TNF- α -Standards erfolgte unter Zugabe von Kalibratorverdünnung RD6-33 mit nachfolgendem fünfminütigem und dezentem Mixen unmittelbar vor Anfertigung der Verdünnungsreihe. Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wurden 200 µl der entsprechenden Kalibratorverdünnung in ein Polypropylenröhrchen gegeben. Unter Verwendung einer Stammlösung wurde die folgende Verdünnungsreihe generiert:

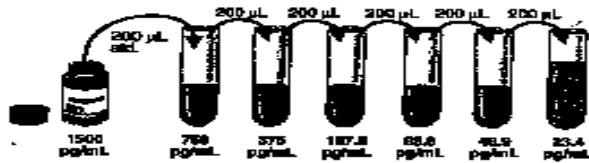


Abbildung 6: Schema der Herstellung der Verdünnungsreihe eines Immunoassays für TNF- α

Vor dem Transfer ins nächste Röhrchen war jede Verdünnung kräftig zu mischen. Der unverdünnte TNF- α -Standard diente dabei als höchster Standard (1500 pg/ml), die passende Kalibratorverdünnung als Nullstandard (0 pg/ml).

Die Farbreagenzien A und B, als Substratlösungen verwendet, waren innerhalb von 15 Minuten vor Gebrauch zu gleichen Volumina lichtgeschützt zusammenzumischen. Zur Durchführung des Assays waren alle Proben und Reagenzien, auf Raumtemperatur zu erwärmen. Der Test hat gemäß dem Standard in doppelter Ausführung stattgefunden. In das Zentrum jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 μ l der Assay-Verdünnung RD1-63 und dann anschließend jeweils 50 μ l Standard, Kontrolle oder Probe hinzugefügt. Zum Durchmischen wurde die Platte für eine Minute sanft geklopft. Im Anschluss inkubierten wir die Platte nach Abdeckung mit einem selbstklebenden Streifen für zwei Stunden bei Zimmertemperatur. Hiernach wurde der Inhalt jeder Vertiefung fünf Mal aspiriert und mit jeweils 400 μ l Waschpuffern gewaschen. Dann wurden 100 μ l Konjugat jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte zugegeben. Erneut wurde die abgedeckte Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die oben beschriebene Aspiration und Waschprozedur wurden wiederholt. 100 μ l der Substratlösung wurden jeder Probe zugefügt. Die erneute Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtprotektion war der nächste Durchführungsschritt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 100 μ l der Stopplösung in jedes Mikrotiterfach appliziert. Zum Durchmischen erfolgte wiederum sanftes Klopfen der Platte. Innerhalb der folgenden 30 Minuten wurde bei einer Wellenlänge 450 nm die photometrische Absorption bzw. die optische Dichte am Photometer Fluostar Galaxy der Fa. BMG LabTechnologies, Offenburg, Deutschland gemessen.

Für die Auswertung und Kalkulation der Daten wurde der Durchschnitt der zweifachen Messungen für jeden Standard, jede Kontrolle und jede Probe gebildet und der Durchschnitt der optischen Dichte des Nullstandards subtrahiert. Zur Anfertigung einer Standardkurve wurde ebenfalls die Software der Fa. BMG LabTechnologies zur die Generierung einer 4-Parameter-logistischen (4-PL) Kurvenform verwendet.

3.4.9.3 Bestimmung der Myeloperoxidase MPO

Für die Gewebepreparation zur Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) wurden von dem kryokonservierten Lebergewebe je Probe von 100 bis 150 mg, die unmittelbar postoperativ und nach acht Stunden der Perfusion gewonnen wurden, eingewogen, und in einem Röhrchen unter Zusatz der unten aufgeführten Reagenzien mit dem Ultra-Turrax T25 der Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland desmembraniert und dann auf Eis gesammelt. Für jede Probe wurden 2 ml 0,05M KPE-Puffer pH 6,0 versetzt mit 0,5 % HTAB benötigt. Beide Reagenzien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Herstellung des KPE-Puffers 0,05 M:

6,81 g KH₂PO₄ (sauer, 136.09 g/mol) und 4 g K₂EDTA in 1000 ml a. d. lösen und den pH-Wert (6,0 und 5,4) mit 0,2 M K₂HPO₄ (basisch, 178.18 g/mol) einstellen.

Die Proben wurden nun 15 Minuten bei 3500 x g bei Raumtemperatur mit der Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland zentrifugiert, bis die Überstände möglichst klar waren. 1 ml des Überstandes wurde in Eppendorfröhrchen pipettiert und zwei Stunden bei 60 °C im Heraeus-Inkubator Typ B 6060 der Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut für ca. zwei Minuten bei 15.000 x g in der Eppendorf-Zentrifuge Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg zentrifugiert. Die Überstände wurden für die MPO-Bestimmung verwendet.

Es schloss sich die Standard-Herstellung nach den folgenden Schritten an:

1 U/ml MPO = 1000 mU/ml = 1 U/ml wurden in KPE pH 5,4 gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die aufgetauten Standardkonzentrate (= höchster Standard) wurden im Verhältnis 1:2 mit KPE-Puffer pH 5,4 verdünnt und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Verwendet wurden Standards der Konzentrationen 15,7 / 31,25 / 62,5 / 125 / 250 / 500 und 1000 mU/ml. Als Leerwert diente der KPE-Puffer 0,05 pH 5,4. In eine 96-well-Mikrotiterplatte wurden 25 µl Leerwert (doppelt), Standard (doppelt) und die Proben pipettiert. Dann wurden 25 µl TMB-Lösung und anschließend 190 µl H₂O₂-Lösung zugegeben. Die Färbung auf der Platte schlug nach blau um. Nach gründlichem Mischen erfolgte die Inkubation für fünf Minuten bei 37 °C im oben genannten Inkubator. Nach Zugabe von 50 µl 2 M H₂SO₄ nahmen alle Proben eine gelbe Färbung an. Am Photometer Floostar Galaxy der Fa. BMG LabTechnologies, Offenburg, Deutschland wurde die Extinktionsänderung bei 450 nm gemessen.

Der Rest der Probe wurde zur Protein-Bestimmung verwendet. Hierzu wurde das Protein mit 100 bis 200 μl HClO_4 ausgefällt, gründlich gevortext mit dem Gerät MS1 Minishaker der Fa. IKA Works, INC, Wilmington, NC und erneut kurz mit der Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf- Netheler-Hinz GmbH, Hamburg zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde verworfen und das Pellet zur weiteren Bestimmung gewaschen:

Zugabe von 2 ml destilliertes Wasser zum Pellet und Röhrchen vortexen mit dem MS1 Minishaker der Fa. IKA Works, INC, Wilmington, NC, 10 bis 15 Minuten scharfe Zentrifugation mit der Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf- Netheler-Hinz GmbH, Hamburg bei 3300 x g. Dann wurde der Überstand abpipettiert. Abermals Zugabe von 2 ml destilliertem Wasser, vortexen und zentrifugieren mit den oben genannten Geräten, Überstand abpipettieren, Zugabe von 2 ml Aceton, um das Pellet zu lösen, ebenfalls 10 bis 15 Minuten scharf zentrifugieren bei 3300 x g. Nach Abkippen des Aceton-Überstandes wurde das Pellet gut getrocknet, bis alle Aceton-Rückstände verdampft waren.

Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde nun in 1 ml 1 M NaOH gelöst. Der Vorgang wurde im Wasserbad beschleunigt. Da die Proteinkonzentration im Gewebe meist recht hoch ist, wurde eine Verdünnung der gelösten Proben von 1:51 als sinnvoll erachtet und durchgeführt:

Bei 100 mg Einwaage der Leberprobe und einer Verdünnung von 1:51 stellten wir mit 750 μl aqua dest. und 15 μl gelöste Probe eine Mischung her, analog dieser Formel wurden bei unterschiedlichen Einwaagen unterschiedliche Verdünnungen erforderlich.

Die Standard wurde mit Rinder-Albumin BSA, gelöst in a.d. hergestellt. Dieser wurde in einer Verdünnungsreihe 1:2 verdünnt, bis die Konzentration 62,5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht war (verwendet wurden 500 / 250 / 125 / 62,5 $\mu\text{g/ml}$).

Für die Protein-Bestimmung wurden 20 μl Probe/Standard/Leerwert in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Standards und Leerwert wurden doppelt bestimmt. Nun setzte man die benötigte Menge des Rea-Mix aus BCA und Kupfersulfatlösung an (Rea-Mix: pro Reihe 4 ml Bichinonic Acid Solution (BCA) + 80 μl CuSO_4 (4%ig)). Man pipettierte 300 μl der BCA- CuSO_4 -Mischung zu den bereits vorgelegten 20 μl Proben in die Mikrotiterplatte und deckte diese ab. Die Platte musste nun zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer Fluostar Galaxy der Fa. BMG LabTechnologies, Offenburg, Deutschland bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Die Angabe der MPO-Konzentration erfolgt in mU pro mg Protein, der MPO-Wert entspricht dem gemessenen, der gemessene Protein-Wert dagegen musste zur Ergebnisermittlung noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden und zur MPO-Konzentration in Beziehung gesetzt werden.

3.5 Die Auswertung

3.5.1 Beschreibung der Versuchsergebnisse und der Statistik

Die Angabe der Glucose erfolgt als prozentuales Verhältnis der Glucosekonzentration des Messzeitpunktes zur Glucosekonzentration der Präperfusion, d.h. die des zirkulierenden Perfusats im extrakorporalen Maschinenkreislauf ohne Disposition der Leber in der Zirkulation. Die Messungen erfolgten alle zwei Stunden und initial nach 30 Minuten der Reperfusion. Die Harnstoffkonzentration wurde in mg/dl/100g Lebergewicht angegeben, der Messmodus glich dem der Glucose. Die Galleproduktion wurde in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht angegeben. Die Messungen erfolgten zur zweiten, vierten, sechsten und achten Stunde der Reperfusion. Der Sauerstoffverbrauch, der Perfusatfluss, der portale sowie der arterielle Fluss wurden in $\text{ml}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht zur halben, zweiten, vierten, sechsten und achten Reperfusionstunde gemessen. Der arterielle Fluss wurde hierbei als prozentualer Anteil am Gesamtfluss berechnet und dargestellt. Der Widerstand wurde in $\text{Torr}/\text{ml}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht analog zu den Messzeitpunkten der übrigen makrohämodynamischen Parameter angegeben. Hinsichtlich des mikrozirkulatorischen tiefen Gewebeflusses wurden Absolutwerte angegeben. Die Messungen erfolgten nach der halben, vierten und achten Stunde der Reperfusion. Die Ergebnisse des Makroskopie-Scores wurden durch Addition der den einzelnen Qualitätsmerkmalen zugeteilten Zahlen zur nullten, zweiten, vierten, sechsten und achten Stunde der Reperfusion ermittelt. Die Angabe der Gewichts Differenz erfolgte als prozentuales Verhältnis zwischen dem unmittelbar nach Explantation gemessenen Lebergewicht und dem nach achtstündiger Perfusion der Leber.

Die gemessenen TNF- α -Werte zur halben, vierten und achten Stunde nach Beginn der Reperfusion wurden in pg/ml angegeben. Die Angabe der RsNO-Werte erfolgte in $\mu\text{mol}/\text{l}$, gemessen wurde zur halben, vierten und achten Stunde nach Beginn der Reperfusion. Die Myeloperoxidase MPO wurde in mU/mg Protein angegeben. Es wurde unmittelbar postoperativ und nach acht Stunden der Reperfusion gemessen.

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit ermittelten Daten sowie deren grafische Darstellungen erfolgten mittels handelsüblichen Statistik- und Grafik-Programmen SigmaStat 3,0 und SigmaPlot 2009 für Windows (Systat Software Inc., San José, CA, USA). Die Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem ANOVA-Test durchgeführt. Parametrische Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung, ordinale Daten als Median und Range dargestellt. Für statistische Tests wurde ein Niveau von $p <$

0,05 als statistisch signifikant angesehen, sowie in den Abbildungen entsprechend mit unterschiedlichen Indizes (z.B. *) gekennzeichnet.

3.5.2 Berechnung der Flusswerte

Die Flussmenge pro Zeiteinheit in ml/min konnte direkt vom Display der jeweiligen Rollerpumpe abgelesen werden. Der Fluss, den die Systemrollerpumpe erzeugte, entsprach dem Gesamtfluss der Leber und wurde einzig durch den konstanten Flüssigkeitsstand im Depotgefäß von genau 25 cm über der Porta hepatis reguliert. Der simultanen physiologischen Blutversorgung der Leber über die Portalvene sowie die Arteria hepatica communis wurde durch getrennte Perfusion beider Systeme Rechnung getragen, wobei die Flussmenge der Arterie druckkontrolliert mit ca. 65 mmHg über eine zweite Rollerpumpe reguliert wurde. Die Perfusion über die Portalvene erfolgte passiv, indirekt gesteuert über die Gesamtflussmenge pro Zeit. Ihr Beitrag zur Perfusion wurde im Folgenden aus der Differenz von Gesamtfluss und arteriellem Anteil gebildet.

3.5.3 Berechnung des Sauerstoffverbrauches

Nach dem Fickschen Prinzip errechnet sich der Sauerstoffverbrauch VO_2 als Produkt aus Durchblutungsgröße Q und der Differenz aus arterieller und venöser O_2 -Konzentration nach der Gleichung:

$$VO_2 = avDO_2 \cdot Q$$

Gleichung 1: Berechnung des Sauerstoffverbrauchs

Die Differenz des Gehaltes des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs im zuführenden arteriellen und ableitenden venösen Blut ergibt hierbei die arterio-venöse Differenz der Sauerstoffkonzentrationen $avDO_2$ gemäß der Formel:

$$avDO_2 = [O_2]_{art.} - [O_2]_{ven.}$$

Gleichung 2: Berechnung der Sauerstoffdifferenz

Die Konzentration an chemisch gebundenem Sauerstoff berechnet aus der Hämoglobinkonzentration $[Hb]$, der Sauerstoffsättigung SO_2 und der Hüfner-Zahl für Blut 1,34:

$$[O_2] = 1,34 \cdot [Hb] \cdot SO_2 \cdot 0,0001$$

Gleichung 3: Berechnung des chemisch gebundenen Sauerstoffs

4 ERGEBNISSE

4.1 Galleproduktion

In der Kontrollgruppe wurden in der ersten Messung nach zwei Stunden der Reperfusion $0,09 \pm 0,05$ μl Galle pro Minute pro g Lebergewicht produziert. In der spendervorbehandelten Gruppe betrug die Galleproduktion zum gleichen Zeitpunkt $0,17 \pm 0,03$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht. Die Galle, die in der Gruppe 3 zur zweiten Stunde anfiel, belief sich auf $0,13 \pm 0,099$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht, während in der Gruppe 4 mit der Reperfusatbehandlung die meiste Galle mit $0,18 \pm 0,06$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewebe anfiel. Für den 2-Stunden-Zeitpunkt konnte im direkten Gruppenvergleich keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Nach vier Stunden der Reperfusion fiel die Galleproduktion der Kontrollgruppe im Vergleich zum Ausgangswert dieser Gruppe auf $0,08 \pm 0,07$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht ab. Der vierstündige Wert der Gruppe 2 nahm in Bezug auf den Gruppenanfangswert ebenfalls mit $0,12 \pm 0,06$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht ab. Die Gruppe der modifizierten Konservierungslösung erreichte mit $0,17 \pm 0,09$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht ihren höchsten Wert in der Galleproduktion während der gesamten achtstündigen Reperfusionsphase, was gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied darstellt ($p < 0,05$). Mit einem Wert von $0,2 \pm 0,06$ μl auf ein Gramm Lebergewicht/Minute zur vierten Stunde stieg in der Gruppe 4 die Leistung der Galleerzeugung, wobei im Vergleich zur Gruppe 1 ebenfalls eine Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($p < 0,05$). Nach 6 Stunden der extrakorporalen Perfusion erreichte die Kontrollgruppe eine Galleproduktion von $0,05 \pm 0,04$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht, die Gruppe der spendervorbehandelten Lebern lag mit einem Wert von $0,08 \pm 0,035$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht darüber. In der Gruppe 3 reduzierte sich die Menge der angefallenen Galle gleichfalls auf $0,11 \pm 0,05$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht. Für die Gruppe 4 war ein ähnlicher Trend im Abfall der Galleproduktion zu verzeichnen, so fiel der Wert auf $0,13 \pm 0,06$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht ab. Dennoch war hier eine statistische Signifikanz im Vergleich zum Wert der Kontrollgruppe nachweisbar ($p < 0,05$). Der Endwert der Kontrollgruppe nach acht Stunden Reperfusion erreichte mit $0,04 \pm 0,02$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht einen deutlich niedrigeren Wert als am Perfusionsbeginn. In der Gruppe 2 verzeichneten wir eine Gallenmenge von $0,06 \pm 0,02$ μl auf ein Gramm Lebergewicht pro Minute, was nur geringfügig unter der Gallefreisetzung der HTK-behandelten Gruppe mit $0,07 \pm 0,03$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht und der der Gruppe 4 mit $0,09 \pm 0,03$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht lag. Für den 8-Stunden-Meßpunkt konnten keine Signifikanzen erzielt

werden. Die Abbildung 7 zeigt die Entwicklung der Galleproduktion für alle vier Gruppen während der achtstündigen Perfusion.

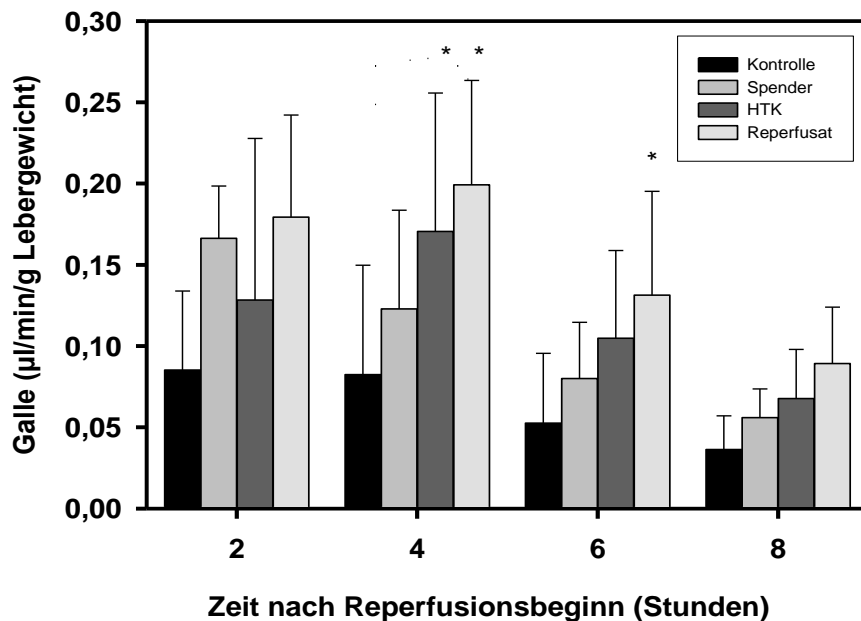


Abbildung 7: Galleproduktion aller vier Gruppen über die gesamte achtstündige Perfusionszeit. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) für den Messpunkt nach vier Stunden zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe 3 sowie zwischen der Kontrollgruppe und Gruppe 4, für den Messpunkt nach sechs Stunden zwischen der Kontrollgruppe und Gruppe 4.

4.2 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch betrug in der Gruppe 1 nach 30 Minuten $0,019 \pm 0,007$ ml/min/g Lebergewicht, in der Gruppe 2 lag der Wert zum selben Messpunkt bei $0,021 \pm 0,008$ ml/min/g Lebergewicht. Die Gruppe 3 wies einen Sauerstoffverbrauch von $0,017 \pm 0,006$ ml/min/g Lebergewicht auf, während die Reperfusatgruppe den höchsten halbstündlichen Wert mit $0,028 \pm 0,008$ ml/min/g Lebergewicht erzielte. Im direkten Vergleich lag der Sauerstoffverbrauch der Gruppe 4 zur halben Stunde statistisch signifikant über dem der Gruppe 1 und dem der Gruppe 3 ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf blieb der 2-Stunden-Wert der Kontrollgruppe mit $0,019 \pm 0,009$ ml/min/g Lebergewicht nahezu auf dem Ausgangsniveau. Ähnlich verhielten sich auch die anderen Gruppen, wo in Gruppe 2 nach 120 Minuten der Wert auf $0,023 \pm 0,008$ ml/min/g Lebergewicht stieg. Für die Gruppe 3 war ein Sauerstoffverbrauch von $0,020 \pm 0,007$ ml/min/g Lebergewicht zu verzeichnen, der in Gruppe 4 mit $0,032 \pm 0,009$

ml/min/g Lebergewicht deutlich übertroffen wurde. Statistisch signifikant lag dieser Wert über denen der Gruppen 1 und 3 ($p < 0,05$). Nach 4 Stunden war der Sauerstoffverbrauch der Kontrollgruppe mit $0,021 \pm 0,011$ ml/min/g Lebergewicht in Bezug zum Vorwert nur leicht erhöht. Analog verhielt es sich mit der Gruppe 2, die einen 240-Minuten-Wert von $0,025 \pm 0,008$ ml/min/g Lebergewicht aufwies. Der Wert der Gruppe 3 betrug $0,020 \pm 0,006$ ml/min/g Lebergewicht, der zum gleichen Messpunkt aufgenommene der Gruppe 4 $0,033 \pm 0,011$ ml/min/g Lebergewicht, was statistisch signifikant zu dem der Gruppe 3 und der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) war. Die Messung des Sauerstoffverbrauches nach sechsständiger Perfusion ergab für die Gruppe 1 einen Wert von $0,020 \pm 0,007$ ml/min/g Lebergewicht, der der Gruppe 2 lag mit $0,021 \pm 0,009$ ml/min/g Lebergewicht nur wenig darüber. Bei Gruppe 3 wurden $0,019 \pm 0,005$ ml/min/g Lebergewicht Sauerstoff zum selbigen Messpunkt gemessen. Die Gruppe 4 hielt mit $0,031 \pm 0,009$ ml/min/g Lebergewicht das Niveau der Vorwerte, worin sich im Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied zu allen anderen Gruppen zeigte ($p < 0,05$). Der Signifikanzunterschied der Werte der Reperfusionatgruppe zu den anderen 3 Gruppen war auch zum Endpunkt der Reperfusion nach 8 Stunden festzustellen ($p < 0,05$). Der Sauerstoffverbrauch der Gruppe 1 betrug $0,019 \pm 0,005$ ml/min/g Lebergewicht, der der Gruppe 2 $0,022 \pm 0,009$ ml/min/g Lebergewicht. Der Verbrauch der Gruppe 3 belief sich auf $0,018 \pm 0,003$ ml/min/g Lebergewicht, während der Endwert der Gruppe 4 mit $0,030 \pm 0,011$ ml/min/g Lebergewicht angegeben werden konnte. Der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs über den Verlauf der gesamten Perfusion in allen vier Gruppen wird in Abbildung 8 wiedergegeben.

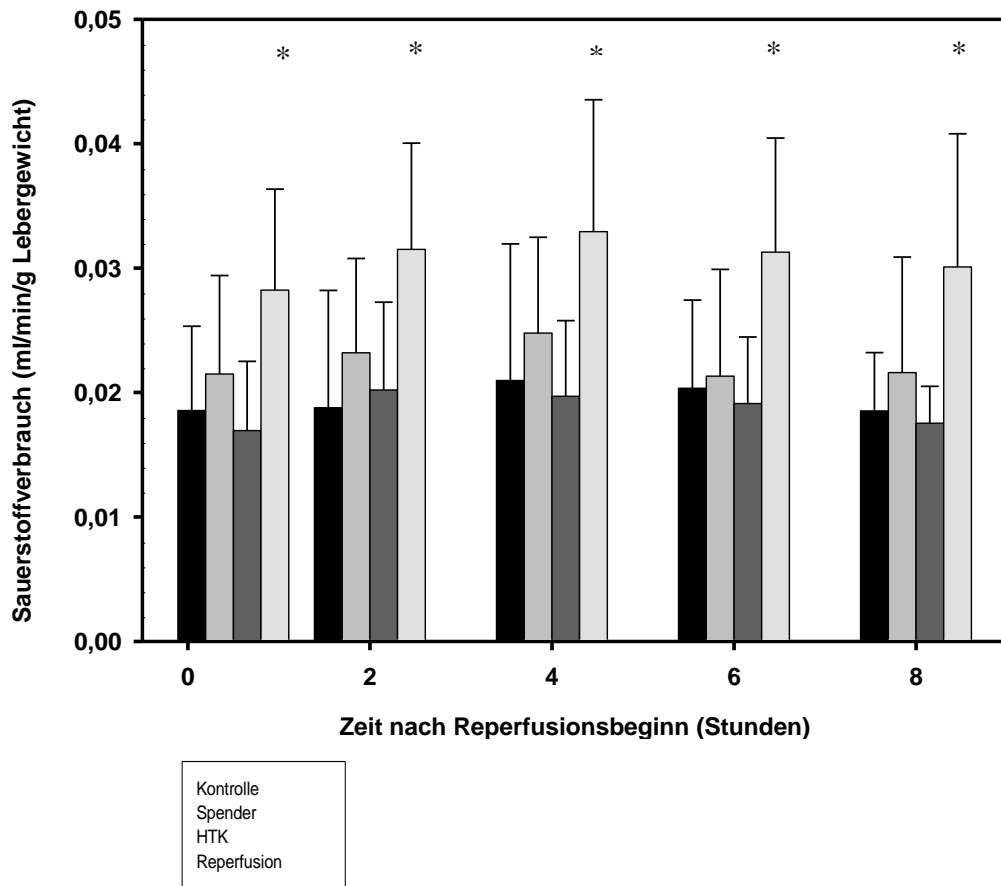


Abbildung 8: Sauerstoffverbrauch aller vier Gruppen während der achtstündigen Reperfusion. Statistische Signifikanzen ($p < 0,05$) zu den Messzeitpunkten nach 0,5, zwei, vier, sechs und acht Stunden zwischen der Gruppe 4 und jeweils zwei bzw. zu allen anderen Versuchsgruppen an den beiden letzten Messzeiten.

4.3 Harnstoff

Der Harnstoff stieg in der Gruppe 1 von $0,77 \pm 0,30$ mg/dl/100 g Lebergewicht, gemessen zur ersten halben Stunde der Reperfusionphase, auf $2,39 \pm 0,32$ mg/dl/100 g Lebergewicht nach 120 Minuten. Nach vier Stunden betrug die Harnstoffkonzentration dann $3,80 \pm 1,5$ mg/dl umgerechnet auf 100 g Lebergewicht. Die Dynamik der Steigerung schwächte sich leicht ab, zur sechsten Stunde der Reperfusion eruierten wir eine Konzentration von $4,31 \pm 1,58$ mg/dl/100 g Lebergewicht, die sich bis zum Endmesspunkt nach acht Stunden auf $4,75 \pm 1,91$ mg/dl/100 g Lebergewicht anstieg. In der Gruppe 2 war zum 30-Minuten-Meßpunkt eine Harnstoffkonzentration von $1,09 \pm 0,62$ mg/dl/100 g Lebergewicht aufzunehmen, diese erhöhte sich nach 120 Minuten auf $1,55 \pm 0,71$ mg/dl/100 g Lebergewicht, nach 240 Minuten auf $2,97 \pm 1,20$ mg/dl umgerechnet auf 100 g Lebergewicht. Zur sechsten Stunde betrug die

Harnstoffkonzentration $3,35 \pm 1,41$ mg/dl/100 g Lebergewicht, welche ihren höchsten Wert am Ende der achtstündigen Perfusion mit $3,86 \pm 1,60$ mg/dl/100 g Lebergewicht erreichte. In der Gruppe 3 erhöhte sich die initiale Harnstoffkonzentration von $0,89 \pm 0,34$ mg/dl/100 g Lebergewicht, gemessen nach 30 Minuten, auf $1,86 \pm 0,68$ mg/dl/100 g Lebergewicht nach 120 Minuten. Zum Messzeitpunkt nach vier Stunden lag die Konzentration bei $2,81 \pm 1,06$ mg/dl/100 g Lebergewicht, nach sechs Stunden waren $3,39 \pm 1,22$ mg/dl/100 g Lebergewicht zu erheben. Der 8-Stunden-Wert der Gruppe 3 lag bei $3,86 \pm 1,57$ mg/dl auf 100 g Lebergewicht. Die Reperfusiongruppe wies initial nach 30 Minuten eine Konzentration von $0,69 \pm 0,41$ mg/dl/100 g Lebergewicht Harnstoff auf. Der nach zwei Stunden gemessene Wert betrug $2,07 \pm 0,71$ mg/dl/100 g Lebergewicht, die Konzentration stieg dann auf $3,40 \pm 0,96$ mg/dl/100 g Lebergewicht zur vierten Stunde. Diese Dynamik setzte sich fort, nach sechs Stunden fanden wir eine Harnstoffkonzentration von $4,10 \pm 1,24$ mg/dl auf 100 g Lebergewicht, welche am Endmesszeitpunkt auf $5,05 \pm 1,34$ mg/dl/100 g Lebergewicht zugenommen hatte. Es lagen zu keiner Messzeit im Gruppenvergleich statistische Signifikanzen vor. Die Harnstoffkonzentrationen von allen vier Versuchsgruppen im gesamten Perfusionsverlauf zeigt die Abbildung 9.

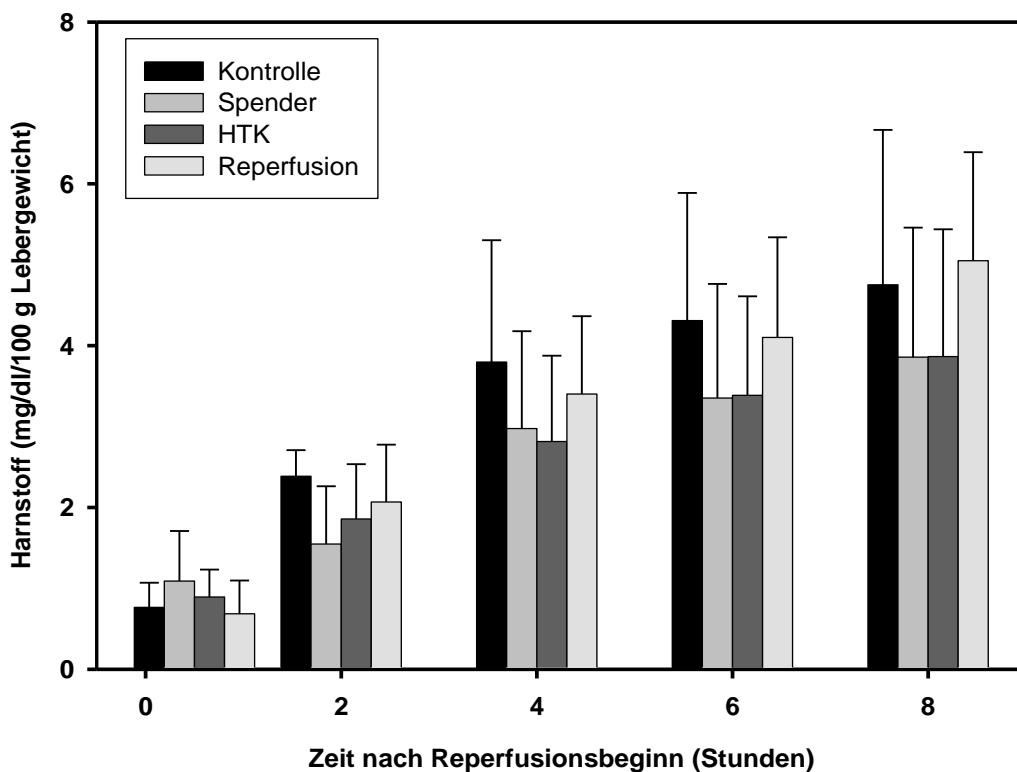


Abbildung 9: Harnstoffkonzentration aller vier Gruppen während der Reperfusion.

4.4 Glucose

Nach 30 Minuten der Reperfusion wurde in der Gruppe 1 eine Steigerung der Glucosekonzentration von $157,54 \pm 60,97$ % im Vergleich zur Präperfusion erreicht. In der Gruppe 2 fiel die Steigung mit $149,80 \pm 85,86$ % geringfügig schwächer aus. In der HTK-behandelten Gruppe konnten $133,16 \pm 66,25$ % der Glucosekonzentration der Präperfusion gemessen werden. Die Gruppe 4 wies mit $113,34 \pm 66,27$ % zur halben Stunde den geringsten Wert aller Gruppen auf. Nach 120 Minuten fiel die Abweichung der Glucosekonzentration der Kontrollgruppe im Vergleich zur Präperfusion mit $134,32 \pm 75,33$ % geringer aus als zur halben Stunde. Der 2-Stunden-Wert der spendervorbehandelten Gruppe zeigte eine ähnlich abfallende Tendenz, er betrug $139,39 \pm 86,69$ %. Der zur selben Zeitpunkt erhobene Wert der Gruppe 3 fiel unter den der Präperfusion, die Konzentration hierbei war $95,59 \pm 61,95$ % der Basiskonzentration der Präperfusion. In der Reperfusatgruppe fiel die Glucosekonzentration mit $89,30 \pm 115,11$ % nach 120 Minuten sogar noch deutlicher unter die des Ausgangswertes. Der Abfall der Glucosekonzentration in der Gruppe 1 setzte fort, zur 4. Stunde der Reperfusion betrug die prozentuale Abweichung zur Basisglucosekonzentration der Präperfusion $91,78 \pm 63,80$ %, in der Gruppe 2 wurden $96,40 \pm 78,32$ % verzeichnet. Nach 4 Stunden war in der Gruppe 3 mit $55,09 \pm 55,90$ % die niedrigste relative Glucosekonzentration im zirkulierenden Reperfusat nachzuweisen. Der Gruppe 4 wurde zum selben Messpunkt ein prozentualer Verhältniswert von $67,53 \pm 89,67$ % zugeordnet. Die erhobenen prozentualen Glucosewerte nach sechs Stunden der Maschinenreperfusion wiesen weiterhin den deutlichen Abwärtstrend aus, so betrug der Wert für die Gruppe 1 $72,66 \pm 60,43$ %, der der Gruppe 2 $85,92 \pm 83,17$ %. Mit $32,18 \pm 76,14$ % fiel die Glucosekonzentration der Gruppe 3 unter einem Drittel des Basiswertes ab, die der Gruppe 4 halbierte sich fast nach sechs Stunden auf $53,27 \pm 100,01$ %. Zum Ende der Reperfusion lag der Wert der Kontrollgruppe bei $56,34 \pm 59,96$ % im Vergleich zur Präperfusion, der Endwert der Gruppe 2 nach achtstündiger Reperfusion war mit $69,27 \pm 81,24$ % ebenso der niedrigste in der gesamten Messreihe der Gruppe. Die Glucosekonzentration in der Gruppe 3 betrug zum Ende $22,79 \pm 68,23$ % des Basiswertes, in der Gruppe 4 konnten $44,90 \pm 106,07$ % relativ zum Wert der Präperfusion gemessen werden.

Zu keinem Messzeitpunkt stellten die Unterschiede zwischen den prozentualen Glucosewerten im Gruppenvergleich eine statistische Signifikanz dar. In der Abbildung

10 wird der Verlauf der prozentualen Glucosewerte im Vergleich zur Präperfusion für alle vier Gruppen über den Gesamtperfusionszeitraum veranschaulicht.

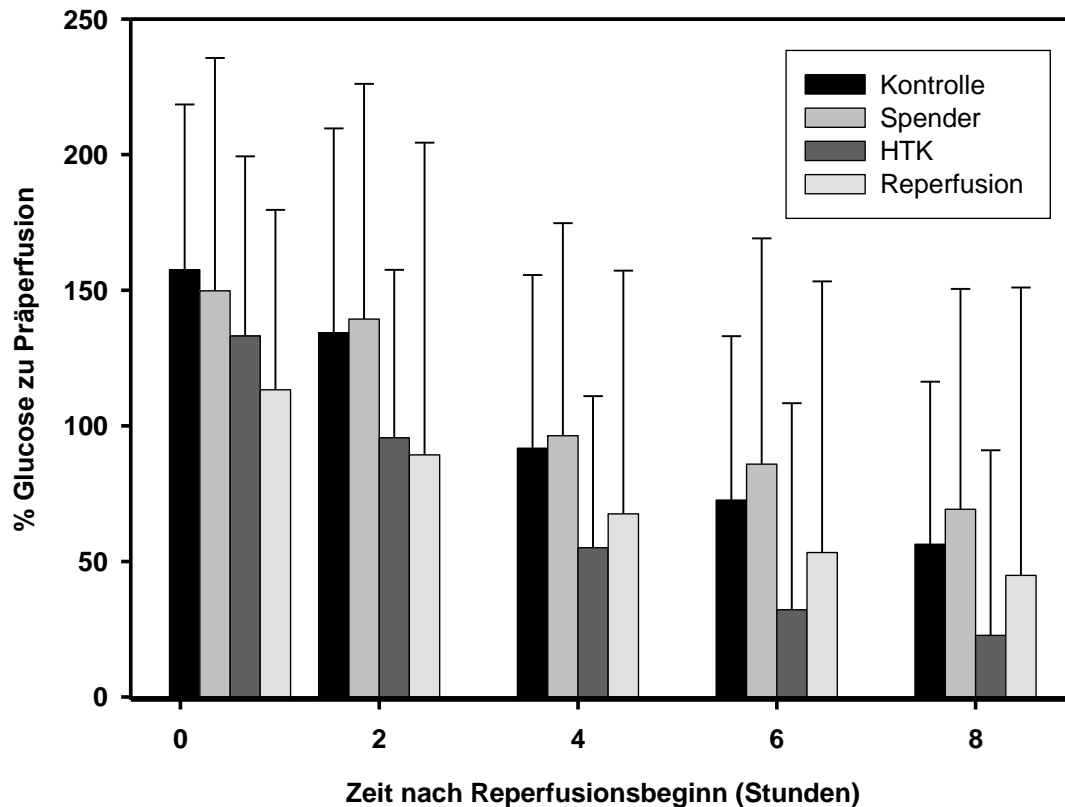


Abbildung 10: Prozentuale Glucoseabweichungen im Vergleich zur Präperfusion während der achtstündigen Perfusion dargestellt von allen Versuchsgruppen.

4.5 Makrohämodynamik

4.5.1 Perfusatfluss pro Gramm Lebergewicht

Der Gesamtfluss Perfusat pro Gramm Lebergewicht pro Minute betrug in der Gruppe 1 zur Messzeit nach 30 Minuten $2,181 \pm 0,799$ ml/g Lebergewicht/min. Die Durchblutung pro Gramm Lebergewicht nahm zum Zeitpunkt nach zwei Stunden nur unwesentlich auf $2,194 \pm 0,905$ ml/g Lebergewicht/min zu. Die Zunahme auf $2,33 \pm 1,0$ ml/g Lebergewicht/min war nach vier Stunden der Reperfusionphase stärker. Zur Messung nach sechs Stunden war dann der Abfall des Gesamtflusses auf $2,175 \pm 0,647$ ml/g Lebergewicht/min zu verzeichnen. Nach acht Stunden fiel der Perfusatfluss der Kontrollgruppe unter das Ausgangsniveau auf $1,964 \pm 0,515$ ml/g Lebergewicht/min. Der Gesamtfluss der Gruppe 2 zeigte nach 30 Minuten $2,351 \pm 0,664$ ml/g Lebergewicht/min an, dieser entwickelte nach zwei Stunden der Perfusion zu $2,491 \pm 0,720$ ml/g

Lebergewicht/min, um dann nach weiteren zwei Stunden auf $2,440\pm 0,713$ ml/g Lebergewicht pro Minute abzufallen. Zum Messpunkt nach sechs Stunden konnten $2,104\pm 0,726$ ml/g Lebergewicht/min, nach acht Stunden zum Endpunkt der Perfusion $2,115\pm 0,72$ ml/g Lebergewicht/min gemessen werden. Die Gruppe 3 zeigte initial den geringsten Perfusatfluss aller Gruppen. Die Durchblutung von $1,917\pm 0,509$ ml/g Lebergewicht/min zur halben Stunde erhöhte sich zum Zeitpunkt nach zwei Stunden auf $2,082\pm 0,509$ ml/g Lebergewicht/min. Die sukzessive Abnahme der Durchblutung pro Gramm Lebergewicht erreichte nach vier Stunden Perfusion $2,046\pm 0,463$ ml/g Lebergewicht/min, nach sechs Stunden $1,944\pm 0,403$ ml/g Lebergewicht/min, um schließlich auf den Endwert von $1,634\pm 0,27$ ml/g Lebergewicht/min abzufallen. Der Gesamtfluss der Gruppe 4 stellte die beste Durchblutungssituation pro Gramm Lebergewicht pro Minute im Gruppenvergleich dar. So betrug der 30-Minuten-Ausgangswert $3,119\pm 0,884$ ml/g Lebergewicht/min. Nach zwei Stunden konnten wir pro Gramm Lebergewicht eine Flussrate von $3,269\pm 0,981$ ml/min messen. Diese steigerte sich noch auf $3,283\pm 0,956$ ml/g Lebergewicht/min zum Messzeitpunkt nach vier Stunden. Erst zur nächsten Zeitpunkt nach 360 Minuten war der Wert auf $3,088\pm 0,993$ ml/g Lebergewicht/min abgesunken und unterschritt zur letzten Messung nach acht Stunden den Vorwert mit einer Durchblutungsrate von $2,891\pm 1,024$ ml/g Lebergewicht/min. Zu keinem Zeitpunkt lagen statistische Signifikanzen im Vergleich der Gruppen untereinander vor. In der Abbildung 11 wird der Perfusatfluss aller vier Gruppen gezeigt.

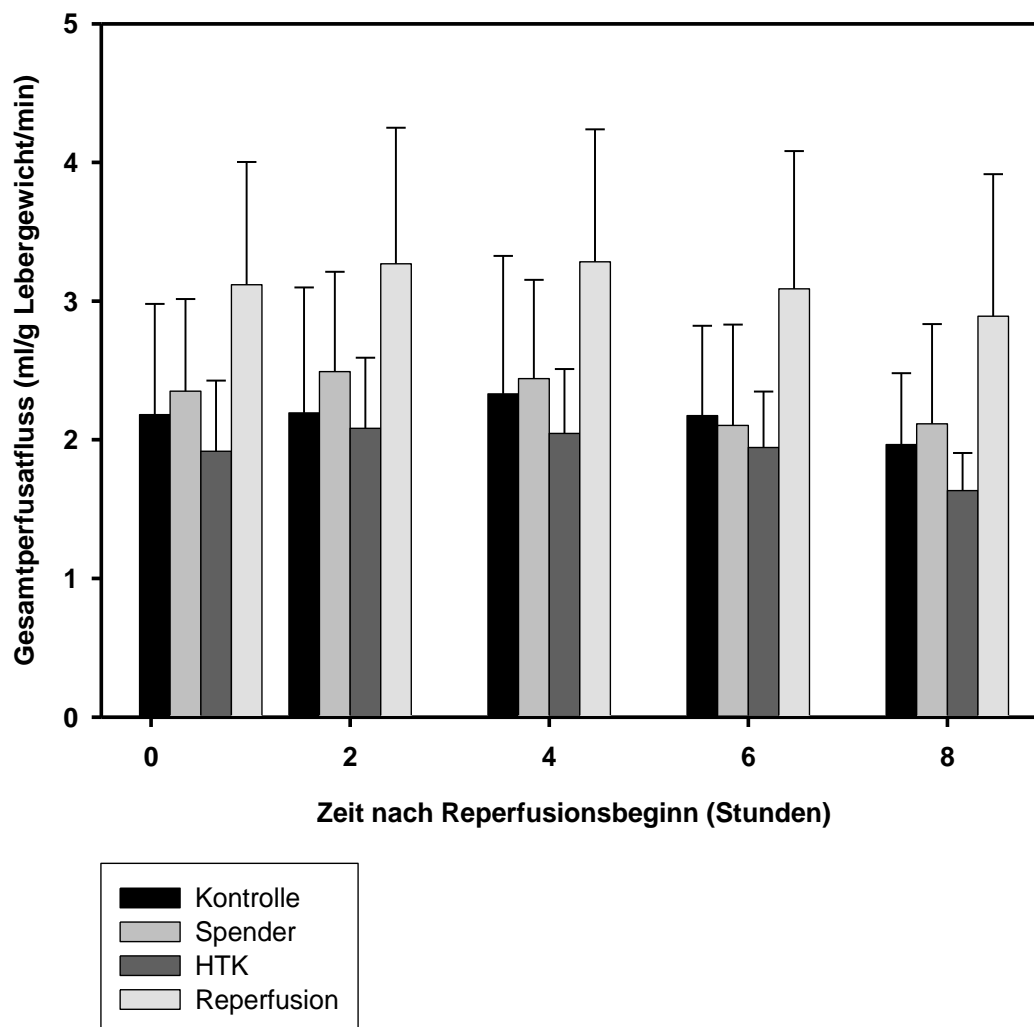


Abbildung 11: Perfusatfluss pro Gramm Lebergewicht pro Minute in allen vier Gruppen während der achtstündigen Perfusion.

4.5.2 Anteil der Arterie am Gesamtfluss pro Gramm Lebergewicht

Zur halben Stunde nach Perfusionsbeginn war die arterielle Versorgung in der Kontrollgruppe zu $16,67 \pm 3,12$ % am Gesamtperfusatfluss pro Minute auf 100 g Lebergewicht beteiligt. Nach 120 Minuten betrug der prozentuale arterielle Anteil $15,14 \pm 2,56$ %, nach 240 Minuten $17,41 \pm 5,58$ %. Zum Zeitpunkt nach sechs Stunden Perfusion war die arterielle Beteiligung am Gesamtfluss dann auf $14,06 \pm 3,24$ %, nach acht Stunden, am Perfusionsende dann auf $12,57 \pm 4,56$ % abgesunken. Der Anteil der arteriellen Versorgung in der spendervorbehandelten Gruppe gestaltete sich wie folgt. Der Wert von $22,79 \pm 6,61$ % wurde nach 30 Minuten gemessen, fiel dann nach 120 Minuten auf $17,65 \pm 7,19$ % ab. Die Gruppe 3 zeigte initial ebenfalls eine Umverteilung

der Flüsse zugunsten der arteriellen Perfusion. Der arterielle Anteil an der Gesamtperfusion lag bei $24,30 \pm 5,78$ % zur halben Stunde und verblieb zum Zeitpunkt nach zwei Stunden mit $23,96 \pm 5,89$ % auf diesem Niveau. Die Gruppe 4 hatte initial den geringsten Anteil der arteriellen Versorgung am Gesamtperfusatfluss, der im Verlauf der Perfusion auf dem niedrigen Niveau stagnierte. Bei einem Ausgangswert von $13,56 \pm 7,49$ % nach 30 Minuten fiel der Wert nur leicht auf $13,30 \pm 5,04$ % nach 120 Minuten ab. Zum Zeitpunkt nach zwei Stunden konnten statistische Signifikanzen im arteriellen Anteil am Gesamtfluss zwischen Gruppe 3 und allen anderen drei Gruppen nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Nach vier Stunden der Perfusion lag der arterielle Anteil der Gruppe 3 bei $24,89 \pm 5,23$ %. Es konnte keine statistische Signifikanz gegenüber dem Wert der Gruppe 1 mit $17,41 \pm 5,58$ %, dem der Gruppe 2, der zum selben Zeitpunkt $19,98 \pm 9,31$ % betrug, und dem der Gruppe 4 mit $14,60 \pm 6,19$ % festgestellt werden. Zur Messung nach sechs Stunden wiederum erzielte die Gruppe 3, deren arterieller Anteil $23,96 \pm 7,89$ % am Gesamtperfusatfluss betrug, einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber Gruppe 1 mit $14,06 \pm 3,24$ %, gegenüber Gruppe 2 mit $17,10 \pm 6,17$ % und gegenüber Gruppe 4 mit $13,14 \pm 5,68$ % ($p < 0,05$). Zum Endpunkt der Perfusion zeigte sich im direkten Vergleich der Gruppen, dass der arterielle Anteil der HTK-modifizierten Gruppe mit $23,74 \pm 7,03$ % sogar statistisch hoch-signifikant gegenüber Gruppe 1 und Gruppe 4 lag ($p < 0,001$). Der Wert der Gruppe 1 betrug $12,57 \pm 4,56$ %, der der Gruppe 4 $10,02 \pm 3,82$ %. Im Vergleich mit Gruppe 2, deren arterieller Anteil sich auf $14,67 \pm 5,54$ % belief, konnte ein signifikanter Unterschied herausgestellt werden ($p < 0,05$). Die Abbildung 12 gibt einen Überblick über den Verlauf des prozentualen arteriellen Anteils am Gesamtfluss in allen vier Versuchsgruppen.

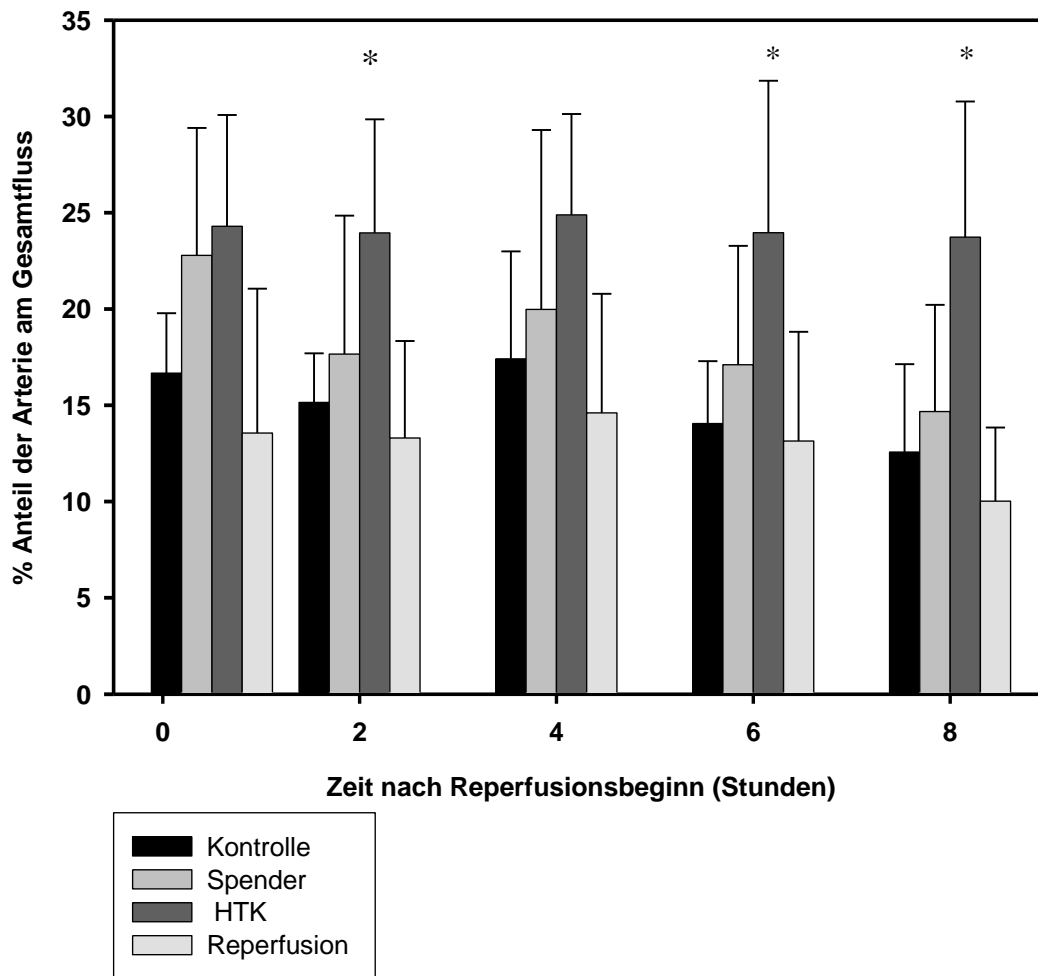


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der Arterie am Gesamtperfusatfluss in allen vier Versuchsgruppen während der achtstündigen Perfusion.

4.5.3 Peripherer Widerstand pro Gramm Lebergewicht

Der periphere Widerstand betrug in der Gruppe 1 zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Perfusionsstart $0,000725 \pm 0,000569$ Torr/ml/min/g Lebergewicht, reduzierte sich im Verlauf der Perfusion auf $0,000692 \pm 0,000329$ Torr/ml/min/g Lebergewicht zum Zeitpunkt nach 120 Minuten und auf $0,00060 \pm 0,000327$ Torr/ml/min/g Lebergewicht zum Zeitpunkt nach 240 Minuten. Nach sechs Stunden der Perfusion stieg der Wert auf $0,00069 \pm 0,000279$ Torr/ml/min/g Lebergewicht an und erhöhte sich weiter auf $0,000827 \pm 0,000215$ Torr/ml/min/g Lebergewicht am Abschluss der Perfusion nach acht Stunden. Im Vergleich hierzu entwickelte sich der periphere Widerstand der Gruppe 2 während der achtstündigen Maschinenperfusion von $0,000415 \pm 0,00014$ Torr/ml/min/g

Lebergewicht nach 30 Minuten über $0,00052 \pm 0,000163$ Torr/ml/min/g Lebergewicht nach zwei Stunden auf $0,000431 \pm 0,000149$ Torr/ml/min/g Lebergewicht nach vier Stunden. Der nach sechs Stunden erhobene Wert von $0,000693 \pm 0,000245$ Torr/ml/min/g Lebergewicht steigerte sich terminal zum Zeitpunkt von acht Stunden noch auf $0,000819 \pm 0,299$ Torr/ml/min/g Lebergewicht. Die Gruppe 3 wies initial mit $0,000513 \pm 0,000222$ Torr/ml/min auf ein Gramm Lebergewicht gerechnet einen höheren Gefäßwiderstand als die Gruppe 2 auf. Mit zunehmender Dauer der Perfusion sank dieser auf einen Zwei-Stunden-Wert von $0,000421 \pm 0,000166$ Torr/ml/min/g Lebergewicht und auf einen Vier-Stunden-Wert von $0,000384 \pm 0,000177$ Torr/ml/min/g Lebergewicht. Am nächsten Messzeitpunkt nach sechs Stunden stieg der Widerstand deutlich auf $0,000770 \pm 0,00100$ Torr/ml/min/g Lebergewicht und nahm während der letzten zwei Perfusionsstunden auf $0,000785 \pm 0,000754$ Torr/ml/min/g Lebergewicht zu. Die Gruppe 4 mit der Reperfusionbehandlung hatte anfängliche Widerstandswerte von $0,000696 \pm 0,000199$ Torr/ml/min/g Lebergewicht, die nach zwei Stunden $0,000562 \pm 0,000183$ Torr/ml/min/g Lebergewicht und nach vier Stunden $0,000521 \pm 0,000208$ Torr/ml/min/g Lebergewicht erreichten. Die Progression der Widerstände setzte sich nach sechs Stunden auf $0,000636 \pm 0,000164$ Torr/ml/min/g Lebergewicht und nach acht Stunden auf $0,000825 \pm 0,000131$ Torr/ml/min/g Lebergewicht fort. Zu keinem Zeitpunkt lagen im Gruppenvergleich statistisch signifikante Unterschiede vor. Die Abbildung 13 unten zeigt die Widerstandsentwicklung aller vier Gruppen.

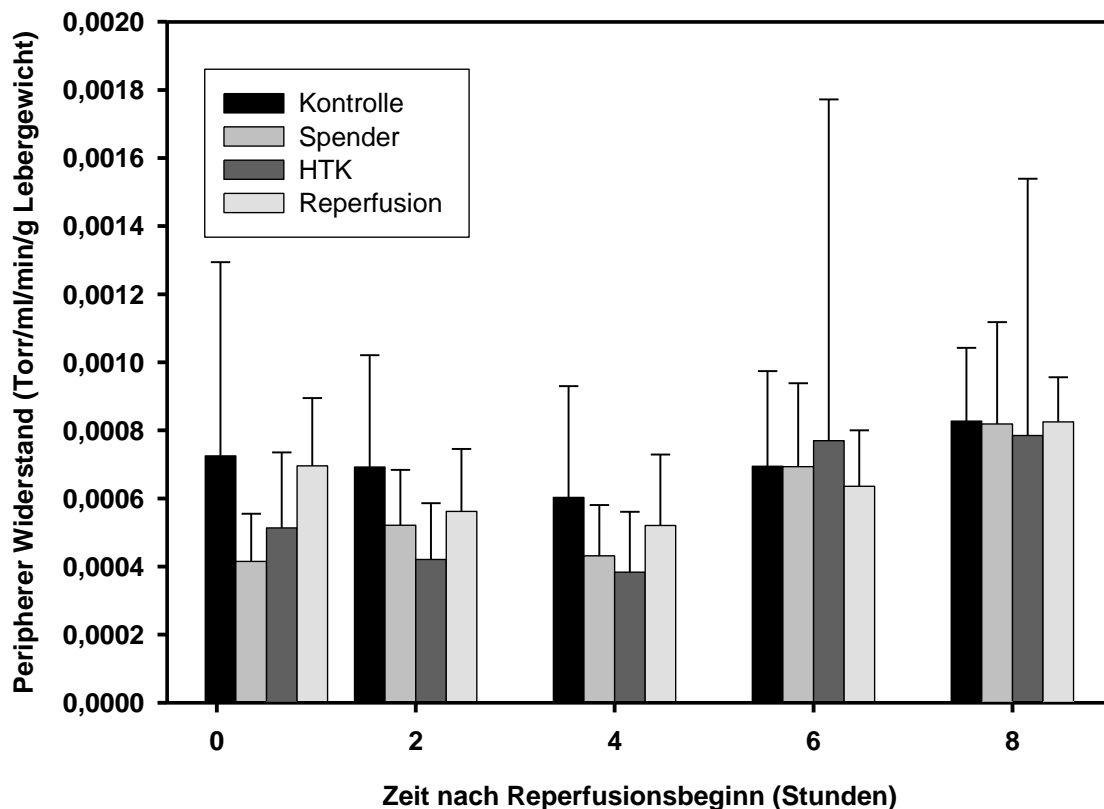


Abbildung 13: Peripherer Widerstand pro Gramm Lebergewicht pro Minute in allen vier Versuchsgruppen während der gesamten achtstündigen Reperfusion.

4.6 Mikrozirkulation

4.6.1 Tiefer Gewebefluss

In der Kontrollgruppe war nach 30 Minuten ein tiefer Gewebefluss von $212,45 \pm 183,60$ zu verzeichnen. Nach vier und acht Stunden der Reperfusion sahen wir in der Kontrollgruppe absolute tiefe Gewebeflusswerte von $205,04 \pm 123,55$ und $184,14 \pm 71,44$. Der absolute tiefe Fluss der Gruppe 2 fiel von $267,63 \pm 62,22$ am Beginn der Perfusion zum Messzeitpunkt nach 30 Minuten auf $193,80 \pm 99,65$ nach vier Stunden und betrug zum Ende der Reperfuionszeit nach acht Stunden $191,86 \pm 80,08$. Die Flussrate der Gruppe 3 reduzierte sich von $251,29 \pm 79,00$ absolut zur halben Stunde auf $194,41 \pm 97,58$ nach vier Stunden. Zur achten Stunde am Reperfuionsende konnte eine weitere Steigerung des tiefen Gewebeflusses auf $225,70 \pm 125,20$ konstatiert werden. In der Reperfuionatgruppe sahen wir initial nach 30 Minuten einen tiefen Fluss von $218,86 \pm 81,08$. Nach vier Stunden wurde ein Wert von $325,68 \pm 117,71$ gemessen, der zur Messendzeitpunkt auf $278,89 \pm 109,93$ gesunken war. Die Abbildung 14 zeigt die

absoluten Werte des tiefen Gewebeflusses für alle Untersuchungsgruppen. Statistische Signifikanzen konnten nicht ermittelt werden.

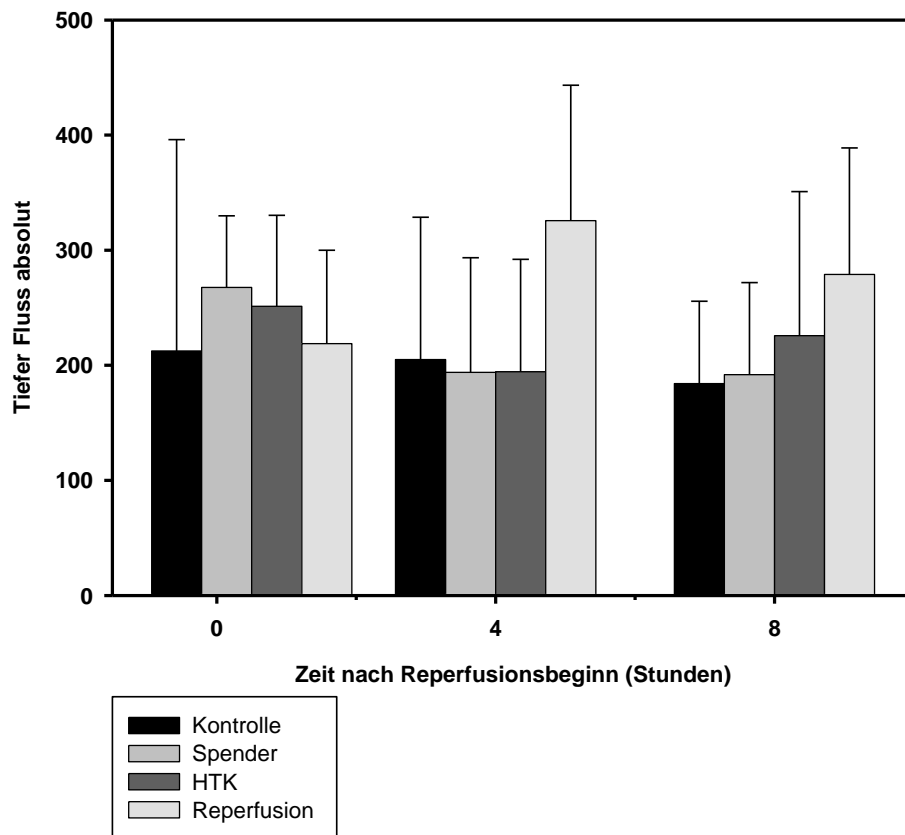


Abbildung 14: Absoluter tiefer Gewebefluss aller Gruppen während der achtstündigen Perfusion zur halben, vierten und achten Stunde der Reperfusion.

4.7 Makroskopische Beurteilung der Lebern

Die Gruppe 1 erreichte nach 120 und 240 Minuten einen Scorewert von $6,25 \pm 1,89$ und $6 \pm 1,63$, was einer leicht reduzierten Organmorphologie und -funktion entspricht, in der letzten Hälfte der Organperfusion verschlechterte sich der Punktwert auf terminal $8,2 \pm 1,92$, was einer zunehmenden Induration des Organs mit vermehrter inhomogener Perfusion und livider Verfärbung entsprach. In der spendervorbehandelten Gruppe dagegen hielten sich die Score-Werte für die makroskopische Beurteilung während der gesamten Perfusion nahezu auf dem Ausgangsniveau von $3,33 \pm 0,52$, erhoben zur zweiten Stunde. Nach 240 Minuten Perfusion konnten $3,67 \pm 0,82$ Punkte ermittelt werden, was einer geringgradig alterierten Organmorphologie mit aber weitgehend rosiger Färbung und größtenteils homogener Perfusion entspricht. Zum Ende der Perfusion fanden wir eine komplett weiche, homogen perfundierte, rosige Leber, deren

Score $3,33 \pm 0,52$ betrug. Die Beurteilung der Gruppe 3 entsprach auch während der gesamten Reperfusionphase dem Anfangsbefund, der einem nur leicht alterierten makroskopischen Eindruck mit weitgehend homogener Perfusion ohne auffallende Organinduration oder starker homogener livider Farbe entsprach. So bewegten sich die Werte der zweiten bis zur achten Stunde zwischen $3,71 \pm 0,95$ und $4,14 \pm 1,46$ Punkte. Die makroskopische Begutachtung der Gruppe 4 fiel geringfügig schlechter aus als die der beiden vorherigen Gruppen. Die Lebern machten vom Perfusionsstatus einen reduzierteren Eindruck mit vermehrt indurierten Arealen und lividerer Verfärbung. Die Scorewerte nach 120 und 240 Minuten betragen $5,28 \pm 2,36$ und $4,86 \pm 2,04$. Zur sechsten und achten Reperfusionstunde verschlechterte sich der makroskopische Anschein leicht, die Punktwerte waren $5,71 \pm 2,21$ und $6,14 \pm 3,18$. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt. Die Abbildung 15 veranschaulicht die unterschiedliche Entwicklung im Makroskopie-Score der verschiedenen Gruppen während der Reperfusion.

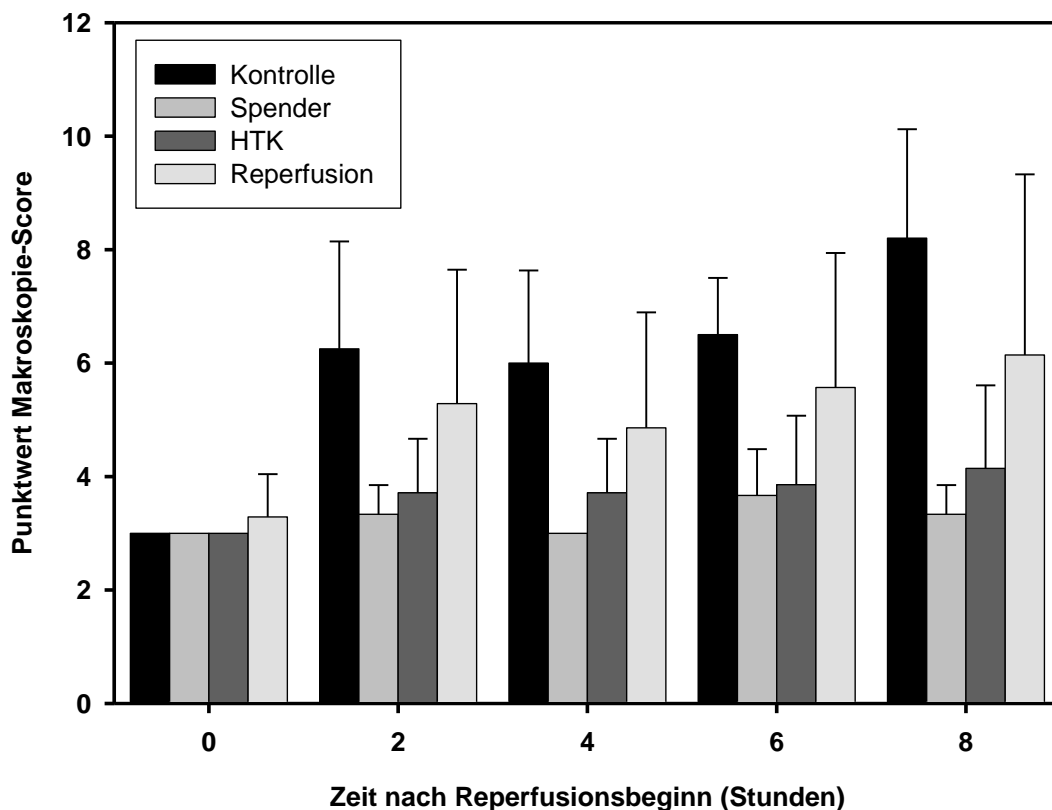


Abbildung 15: Makroskopie-Score während der gesamten Perfusion im Gruppenvergleich. Dargestellt sind die in der jeweiligen Gruppe ermittelten Mediane (mit Range). Der maximal in der Gruppe erreichte Gesamtscorewert ist als Fehlerbalken aufgetragen.

4.8 Prozentuale Gewichts­differenz

So betrug in der Gruppe 1 das Endgewicht nach der Perfusion $29,85 \pm 14,62$ % mehr als unmittelbar nach der Explantation. Für die Gruppe 2 fiel der Gewichtszuwachs von $10,14 \pm 7,42$ % nach der Perfusion im Vergleich zum Ausgangsgewicht weniger drastisch aus als bei der Kontrollgruppe. Bei der Gruppe 3 fanden wir eine Gewichts­differenz von $27,22 \pm 14,99$ %. Das Gewicht­plus in Gruppe 4 machte $21,79 \pm 5,90$ % am Ende der Reperfusion­phase aus. Wir konnten im Vergleich der Gruppenwerte keine statistische Signifikanz aufzeigen. Die Abbildung 16 stellt die prozentuale Gewichts­differenz dar.

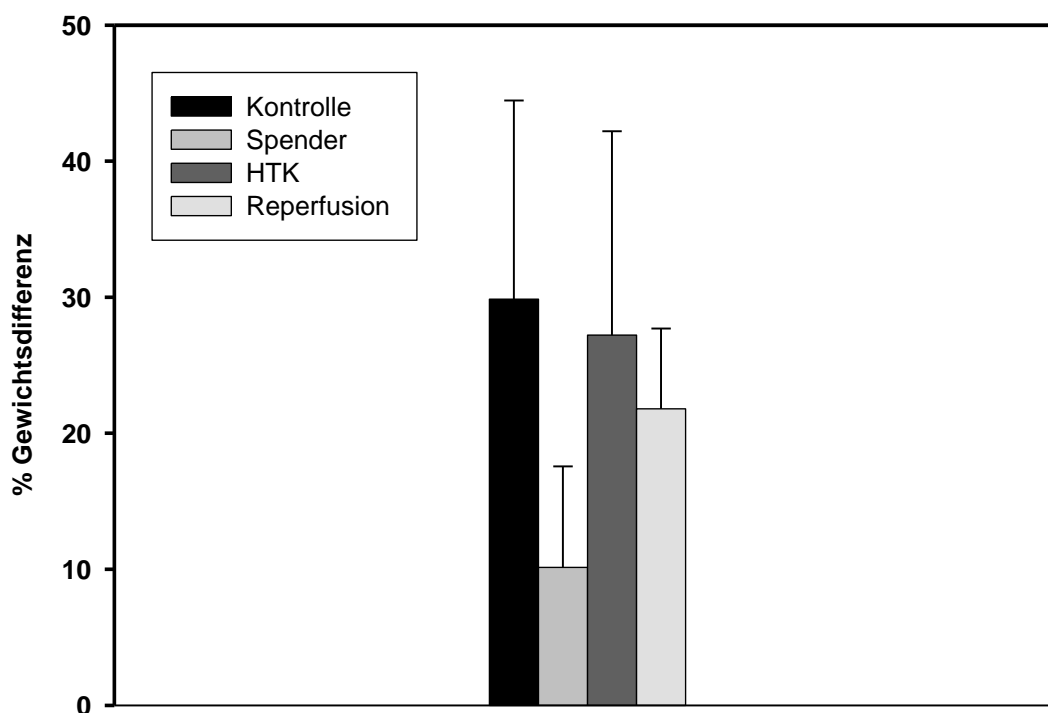


Abbildung 16: Prozentuale Differenz zwischen dem Lebergewicht unmittelbar nach Explantation und nach achtstündiger Reperfusion in allen vier Untersuchungsgruppen. Gegenübergestellt wurden hier die in der jeweiligen Gruppe ermittelten Mediane mit zugehörigem Range.

4.9.1 Mediatoren

4.9.1.1 TNF- α

TNF- α stieg in der Gruppe 1 von dem Ausgangswert von $55,74 \pm 40,86$ pg/ml, gemessen nach 30 Minuten nach Perfusionsbeginn auf $276,87 \pm 196,32$ pg/ml nach vier Stunden. Im weiteren Verlauf erreichte die Kontrollgruppe als Endpunkt nach achtstündiger Perfusion eine TNF- α -Konzentration von $296,86 \pm 180,43$ pg/ml. In der Gruppe 2 stieg die TNF- α -Konzentration von $61,71 \pm 24,56$ pg/ml nach 30 Minuten auf $435,63 \pm 118,27$

pg/ml nach vier Stunden. Im Folgenden fiel die Konzentration nach weiterer Perfusion ab, um ihre Endkonzentration nach acht Stunden von $398,31 \pm 83,98$ pg/ml zu erreichen. In der Gruppe 3 belief sich der nach 30 Minuten gemessene Wert auf $76,89 \pm 75,23$ pg/ml. Während des Zeitpunktes nach vier Stunden war ein steiler Konzentrationsanstieg auf $395,39 \pm 216,56$ zu eruieren. Die letzte Messung nach acht Stunden der Maschinenperfusion ergab für die Gruppe 3 eine TNF- α -Konzentration von $434,87 \pm 203,78$ pg/ml. Die Entwicklung der TNF- α -Konzentration in der Gruppe 4 während der extrakorporalen Perfusion unterschied sich nur unwesentlich von den anderen Gruppen. TNF- α stieg in dieser Gruppe von dem Ausgangswert von $50,99 \pm 20,76$ pg/ml nach 30 Minuten auf $405,66 \pm 453,17$ pg/ml nach vier Stunden. Am Ende wurde eine Konzentration von $417,01 \pm 415,84$ pg/ml gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede im direkten Gruppenvergleich bestanden zu keinem Messzeitpunkt. Die Abbildung 17 zeigt die TNF- α -Konzentration im Verlauf der Perfusion aller vier Gruppen.

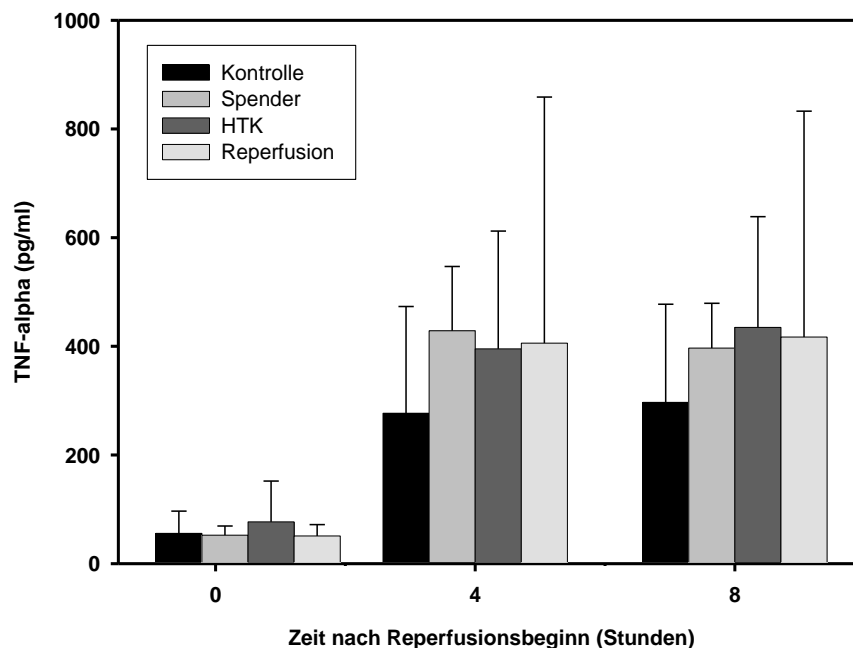


Abbildung 17: TNF- α -Konzentration aller vier Untersuchungsgruppen im Verlauf der achtstündigen Perfusion.

4.9.1.2 Myeloperoxidase (MPO)

Die Konzentration der Myeloperoxidase stieg in der Gruppe 1 von dem direkt postoperativen Ausgangswert $10,48 \pm 3,40$ mU/mg Protein auf $17,41 \pm 6,04$ mU/mg

Protein nach acht Stunden der Maschinenperfusion. In der Gruppe 2 stieg die Konzentration der Myeloperoxidase von initial $12,27 \pm 4,84$ mU/mg Protein nach Explantation auf $15,12 \pm 4,02$ mU/mg Protein am Ende der Reperfusionphase. Die Gruppe 3 erreichte eine anfängliche postoperative MPO-Konzentration von $9,84 \pm 2,30$ mU/mg Protein, die nach acht Stunden $14,92 \pm 2,19$ mU/mg Protein betrug. Die Gruppe 4 zeigte einen Ausgangswert von $13,76 \pm 8,04$ mU/mg Protein und im Verlauf der Perfusion einen Endwert von $14,67 \pm 7,84$ mU/mg Protein. Statistische Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen konnten wir zu keinem Zeitpunkt finden. Die Abbildung 18 veranschaulicht den Verlauf der MPO-Konzentration in allen Gruppen.

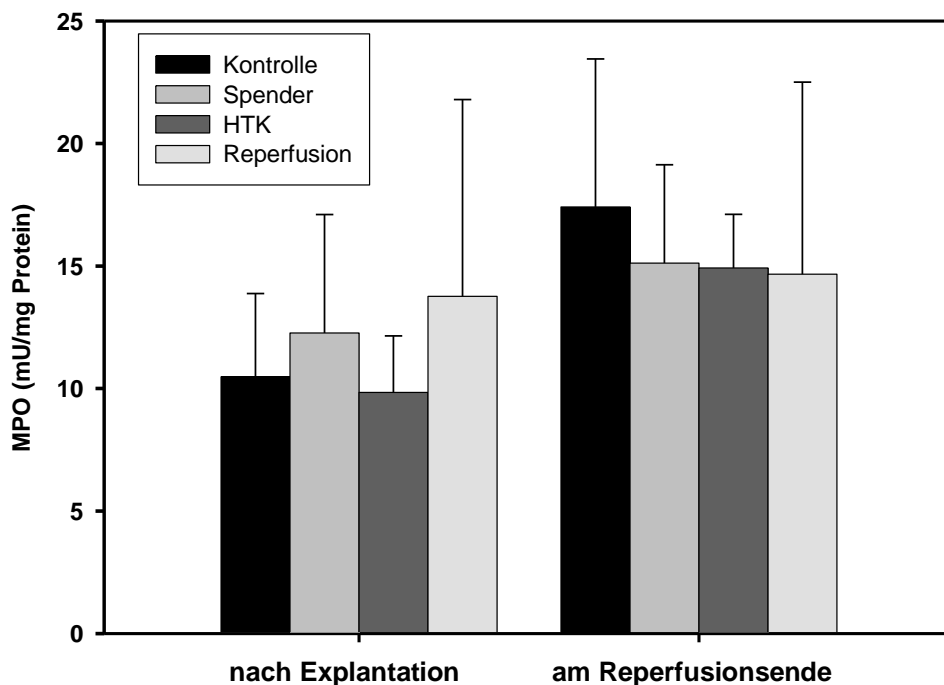


Abbildung 18: MPO-Konzentrationen für alle vier Gruppen unmittelbar postoperativ nach der Organexplantation und nach acht Stunden Perfusion.

4.9.1.3 Stickstoffmonoxid (RsNO)

Die Stickstoffkonzentration in der Gruppe 1 stieg von $2,98 \pm 2,36$ $\mu\text{mol/l}$, gemessen zum Zeitpunkt von 30 Minuten nach Reperfusionbeginn auf $3,81 \pm 2,45$ $\mu\text{mol/l}$ nach vier Stunden der Reperfusion an. Die RsNO-Konzentration der Kontrollgruppe erreichte am Perfusionsende $10,15 \pm 2,42$ $\mu\text{mol/l}$. Die Gruppe 2 wies nach halbstündiger Reperfusion eine Stickstoffmonoxidkonzentration von $3,54 \pm 3,55$ $\mu\text{mol/l}$ auf, die sich nach vier Stunden auf $3,83 \pm 3,21$ $\mu\text{mol/l}$ leicht erhöhte und nach acht Stunden Reperfuionszeit

6,97±2,95 µmol/l betrug. Die RsNO-Konzentration der Gruppe 3 konnten wir nach 30 Minuten mit 3,79±2,04 µmol/l bestimmen, im weiteren Verlauf waren ein vierstündiger Wert von 21,93±44,75 µmol/l und von 8,87±4,08 µmol/l nach acht Stunden zu eruieren. Die Gruppe 4 zeigte eine initiale Stickstoffmonoxidkonzentration von 3,08±2,31 µmol/l nach 30 Minuten, 4,53±2,39 µmol/l nach vier Stunden und 9,88±5,79 µmol/l nach acht Stunden der Perfusion. Keine der Konzentrationen erwies sich im Gruppenvergleich als statistisch signifikant. In der Abbildung 19 wird der Verlauf der RsNO-Konzentration aller Versuchsgruppen gezeigt.

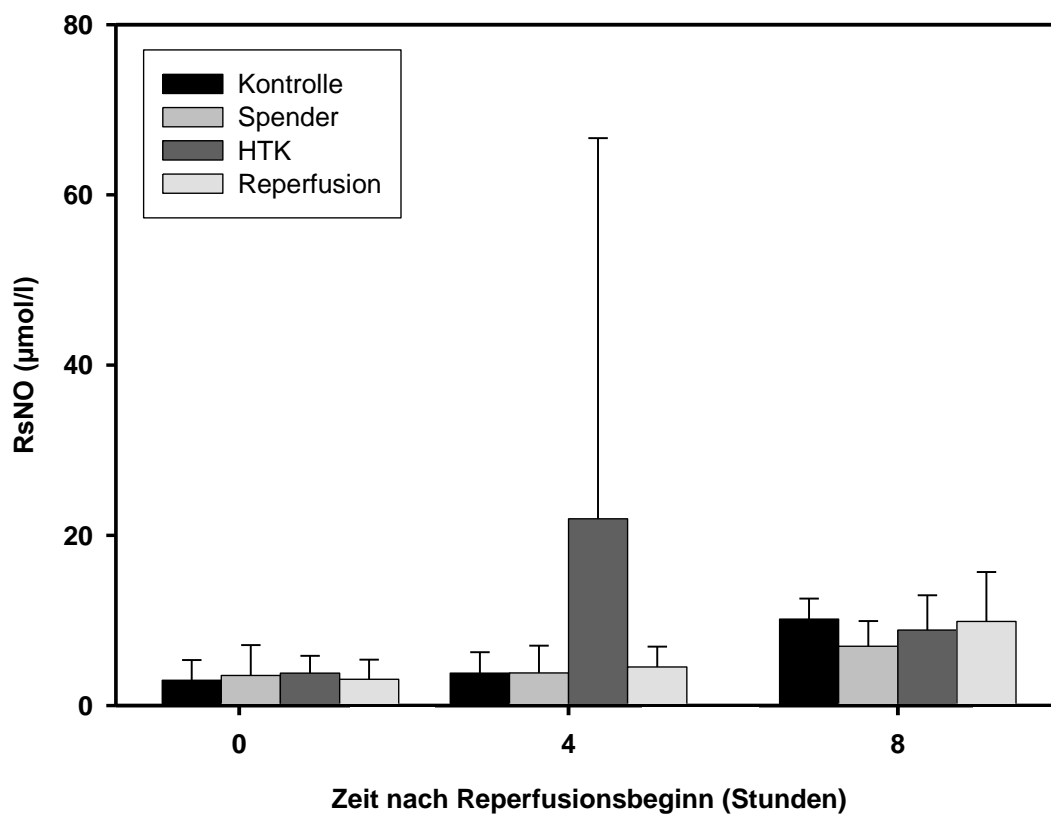


Abbildung 19: RsNO-Konzentration aller Gruppen während der gesamten Perfusion.

5 DISKUSSION

Die Schädigung der Leber durch Ischämie und Reperfusion stellt gerade mit wachsender Zahl marginaler Spenderorgane, die besonders empfindlich auf eine I/R-bedingte Organschädigung reagieren, ein zentrales Problem in der Transplantationschirurgie dar. Ischämiebedingter Verlust an Energiereserven führt durch den Ausfall aktiver Membrantransporter zu Endothelzellschwellung, -dysfunktion und damit einhergehende –aktivierung (Vollmar et al., 1994). Vasokonstriktion, Sludgebildung mit Mikrothrombosierung, Inflammation durch verstärkten Leukozytenarrest und -aktivierung in den Sinusoiden und Generierung freier Sauerstoffradikale sind die daraufhin folgenden Kennzeichen der gestörten hepatischen Mikrozirkulation im Rahmen der Reperfusion (Lemasters et al., 1995). Nonparenchymatöse Zellen der Leber wie Kupffer-, Ito- und Endothelzellen sind dabei empfindlicher gegenüber kalter I/R-Schädigung als Hepatozyten, die eher durch warme Ischämie geschädigt werden (Schön et al., 1998). Prostazyklin scheint besonders geeignet zur Behandlung I/R-bedingter Schädigung der Leber wie eine Vielzahl von vorhergegangenen Studien beweist (Klein et al., 1996, Neumann et al., 2000). Bisherige Studienprotokolle sind den direkten Vergleich zeitlich modifizierter Behandlungskonzepte, angefangen von der Behandlung des Spenderorganismus über die Modifizierung der Konservierungslösung bis zur Empfängerbehandlung schuldig geblieben. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von Iloprost als synthetischem Prostazyklinanalogon zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ausgewählte hepatische Funktions- und Schädigungsparameter mit der Methode der isolierten extrakorporalen normothermen Leberperfusion zu evaluieren. Alle Lebern waren einer 20stündigen Kaltischämie bei 4 °C in HTK-Lösung ausgesetzt. Diese lange Ischämiezeit diente in unserem Modell dazu, eine deutliche Schädigung der Organe zu erzeugen, die den Status eines Marginalorganes hervorrufen könnte. Andere Marginalitätskriterien wiesen die untersuchten Organe nicht auf, da die Lebern von jungen gesunden Spendertieren stammten.

5.1 Bewertung des Versuchsaufbaus

Den definitiven Nachweis der Überlegenheit eines Therapieprotokolls kann letztendlich nur die Transplantation des Organs in einen Empfängerorganismus liefern, da die Evaluation der Leberfunktion und –schädigung, analysiert im artifiziellen isolierten Reperfusionskreislauf, nicht der im Gesamtorganismus gleichzusetzen ist (Mets et al.,

1993). Im klinischen Alltag der Transplantationschirurgie spielt die Qualität des transplantierten Organs die entscheidende Rolle. Der Gesamtempfängerorganismus und das klinische Management sind jedoch für das Outcome nach einer Transplantation wichtige, nicht zu vernachlässigende Einflussfaktoren. Sämtlichen wechselseitigen Einflüssen mit dem Gesamtorganismus entzogen, liefert die Untersuchung im isolierten extrakorporalen Perfusionskreislauf jedoch bei relativ einfacher Handhabung und Durchführbarkeit ohne traktierende Tierexperimente im überschaubaren zeitlichen Rahmen eindeutige Trends und Resultate (Gores et al., 1986), deren Interpretation und Anwendung für klinische Bezüge durchaus relevant sind.

Die normotherme isolierte extrakorporale Leberperfusion erfolgte im rezirkulierenden geschlossenen Kreislauf, dabei wurden beide Gefäßsysteme, die Arteria hepatica und die Portalvene, separat voneinander perfundiert. Die Perfusion der Lebern von Großtieren erfolgt gewöhnlich über die Nutzung des dualen Blutflusssystems der Leber (Butler et al., 2002), bei Rattenleber wird eher die singuläre Portalvenenperfusion bevorzugt (Tolboom et al., 2007). Die duale Perfusionskonzeption gewährleistet jedoch die Aufrechterhaltung und/oder Wiederherstellung der Organfunktion durch verbesserte homogene Perfusionsverteilung (Winkler et al., 1971). Doch auch für Schweinelebern ist die erfolgreiche 72stündige Perfusion nur über die Portalvene unter Hypothermiebedingungen gezeigt worden (Yamamoto et al., 1991). Die Blutversorgung der in einem Depotgefäß frei schwimmenden Leber wurde zum einen über das arterielle Hochdrucksystem durch eine Rollerpumpe druckkontrolliert mit einem an physiologische Verhältnisse angepassten arteriellen Mitteldruck von 60 mmHg sowie passiv, aus einem Vorratsbehälter über das portalvenöse Niederdrucksystem sichergestellt. Hier wurde die Perfusion des nachfolgenden Leberstromgebietes u. a. vom dortigen Widerstand bestimmt. In der Literatur besteht kein Konsens über das optimale Setting der Maschinenperfusion, die Druck- und Flussparameter variieren zum Teil erheblich. 't Hart und Mitarbeiter konnten einen Zusammenhang von Perfusionsdruck und homogener Leberperfusion im Rattenmodell herstellen, hier erzielten Raten von 25 % des physiologischen Flusses die besten Perfusionsergebnisse verbunden mit der besten Endothelzellintegrität ('t Hart et al., 2007). Sicherlich muss an dieser Stelle einschränkend bemerkt werden, dass das größere Volumen und die größere Masse eines Großtierorgans im Vergleich zur Rattenleber zur Kompression der Sinusoiden führen kann, so dass andere Parameter zur vergleichbaren homogenen Perfusion gelten müssten. In anderen Studien von Schweine- und anderen

Großtierlebern wurden jedoch deutlich geringere Gesamtflüsse und Perfusionsdrücke erzielt als in der vorliegenden Arbeit (Guarrera et al., 2005; Vekemans et al., 2008). Dies mag einerseits der Tatsache geschuldet sein, dass diese Versuche unter hypothermen Versuchsbedingungen stattfanden, die wiederum durch eine verlängerte kalte Ischämiezeit vermehrten Endothelzellschaden verursachen (Natori et al., 1999). Das Endothel wird dadurch anfälliger für mechanische Schädigungen durch Scherkräfte, die durch erhöhte Fluss- und Druckparametereinstellungen verursacht werden. Niedrige Temperaturen bedingen zudem eine erhöhte Vasokonstriktion und Rigidität der Endothelien, auch bedingt durch die Veränderung der Fluidität von Phospholipidmembranen, denen man Rechnung tragen muss (Ehringer et al., 2002). Dennoch muss man in unserem Versuchsmodell im Gegensatz zu anderen Versuchskonzepten (Schön et al., 2001) aufgrund des gewählten Settings der portalvenösen Drücke per se von einer Hyperperfusion der Leber in allen Versuchsgruppen ausgehen, die nicht der vasodilatatorischen Wirkung des eingesetzten Prostazyklins zuzuschreiben ist. Derartige mikrohämodynamische Veränderungen in der Durchblutung der Sinusoide werden allerdings auch während der physiologischen Reparaturprozesse nach postischämischem Schaden in situ gefunden wird (Puhl et al., 2005).

Die totale Leberperfusion in vivo im Menschen beträgt ca. 1 ml/min/g Lebergewicht, dabei macht der Anteil der Portalvene, als Kapazitätsgefäß des Niederdrucksystems ca. 75-80 % aus (Rappaport 1980). Aufgrund der hohen Flussraten übernimmt die Portalvene trotz ihres größtenteils desoxygenierten Blutes nahezu die Hälfte der Sauerstoffversorgung der Leber. Dieses Konzept der Blutversorgung spiegelt sich im Versuchsaufbau wider. Die in der Literatur angegebenen Flussraten im Tierexperiment der extrakorporalen Perfusion variieren in weiten Grenzen von 0,14–3,5 ml/min/g Lebergewicht (Dutkowski et al., 2008), wobei nicht in allen Studien die duale Perfusion favorisiert wurde. Bei der visuellen Evaluierung der Lebermorphologie in unserem Morphologie-Score ist die verstärkte Perfusion, die jedoch auf alle Gruppen gleichermaßen zutrifft, zu bedenken. Auf der einen Seite induziert oder vergrößert die Hyperperfusion ihrerseits einen Endothelzellschaden im Transplantatorgan (Menger et al., 1999), andererseits wird die Versorgung mit Sauerstoff gefördert, der eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung und die Wiederherstellung der zellulären ATP-Level und der morphologischen Zellintegrität zu spielen scheint (Vekemans et al., 2007; Dutkowski et al., 2006). Dabei muss wiederum jedoch auch der schädigende

Einfluss des Sauerstoffs diskutiert werden. Die vermehrte Bildung freier Sauerstoffradikale in Anwesenheit von Sauerstoff kann wiederum eine Inflammationskaskade in den Sinusoiden in Gang setzen, die den positiven Aspekten der Sauerstoffwirkung entgegenwirkt.

Die Lebervenen in unserem Versuchsmodell mündeten frei in den Depotbehälter, von einer sterilen Lagerung wurde abgesehen. Ebenfalls zugunsten der Vereinfachung des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung verzichteten wir auf die optimalere, physiologischere druckdichte Lagerung der Leber mit oszillierenden Druckschwankungen als physiologisches Äquivalent der respiratorisch bedingten Zwerchfellbewegung (Neuhaus, Blumhardt 1993). Das Organ war allseits von stets 37 °C temperiertem Perfusat umspült. Durch die kontinuierliche Messung und wenn nötige Korrektur der Perfusatemperatur konnte über den gesamten Zeitraum der Reperfusion eine Temperaturkonstanz von physiologischen 37°C erreicht werden. Ausgehend von der Vermutung, dass das physiologische Milieu auch ex vivo die Vitalität der Leber am besten gewährleistet, wählten wir die normotherme Perfusion (Imber et al., 2002b). Die Vorteile einer hypothermen Maschinenperfusion wie Verringerung des Zellmetabolismus, niedrigerer Bedarf an Nährstoffen und verminderter Sauerstoffverbrauch konnten nicht genutzt werden. Außerdem war das Risiko einer bakteriellen Kontamination während der Perfusion unter normothermen Bedingungen erhöht. Wir begegneten diesem Umstand mit der sequentiellen Gabe von Tobramycin zu Beginn der Perfusion und nach vier Stunden Perfusionszeit. Ziel der Arbeit war es jedoch zu zeigen, nach welchem Therapieregime der optimale Nutzen einer Prostazyklintherapie bei Marginalorganen zu erwarten ist, weshalb mit dem Perfusionsmodell der Spenderorganismus in seinen physiologischen Rahmenbedingungen möglichst vereinfacht darzustellen war. So spiegeln die normothermen Versuchsbedingungen den Reperfusionsschaden, auch in Abhängigkeit von der vorangegangenen Art und Dauer der ischämischen Schädigung, wider. Da normotherme Perfusionskonzepte bspw. in der Protektion von Lebern von nichtherzschlagenden Spender versagten (Reddy et al., 2005), eignete sich unser Modell gerade die erwünschte Verbesserung in Schädigung und Funktion durch den Einsatz von Prostazyklin kontrastiert hervorzuheben.

Das zur Reperfusion verwendete Schweinevollblut, das mit einer plasmavergleichbaren Basis- und Elektrolytlösung verdünnt wurde (Schön et al., 1993) konnte durch Zusatz von Hydroxyäthylstärke (HAES 6 %) in seinen kolloidosmotischen Eigenschaften

verbessert werden. So hat sich der Einsatz von kolloidalen Lösungen zur Vermeidung ischämiebedingten Zellschwellungen bewährt (Jamieson et al., 1988). Der Hämatokrit der verwendeten Perfusionslösung betrug nach allen Verdünnungsschritten des Schweinevollbluts ca. 22-25 %. Das bestmögliche Verhältnis zwischen Perfusatfluss und Sauerstoffversorgung (Riedel et al., 1983) mit einem Hämatokrit von 15 % wurde hier zu Gunsten der Annäherung an physiologische Verhältnisse von Schweinen (Hickman et al., 1974) und in übertragener weiterer Linie zum Menschen ersetzt.

Der Zusammensetzung der Perfusatlösung in unserem Modell mit den Komponenten der Hämofiltrationsbasis- und Elektrolytlösung wurde dementsprechend konzipiert, dass eine physiologischerweise niedrige Kaliumkonzentration einen erhöhten Gefäßwiderstand der Leber verhindern kann. Dies wurde für das Modell der kalten Perfusion gezeigt (Jain et al., 2004).

Von der Leber freigesetzte zelluläre wie metabolische Substrate und Zelldetritus reicherten sich in der Perfusionsflüssigkeit an, ohne dass die Möglichkeit der Elimination bspw. durch Perfusatdialyse oder Austausch der Perfusatlösung bestand. Die Möglichkeit der Schädigung durch toxische Metabolite konnte sich durch deren vermehrten Anfall im Laufe der fortdauernden Perfusion und die Rezirkulation des Kreislaufs während der achtstündigen Perfusion potenzieren. Andererseits ergab sich hier die Möglichkeit der indirekten Messung der sich regenerierenden Leberfunktion über die Zeit, da die Leber singular als Stoffwechselorgan in der Perfusionsapparatur die Elimination einiger Substrate und toxischer Stoffwechselendprodukte aus der Rezirkulation bewirken und somit zur Rekonstitution der Gewebemöostase beitragen konnte. Obwohl also die Akkumulation von Zellzerfallsprodukten und sonstigen schädlichen Metaboliten in dem geschlossenes System während der achtstündigen Perfusion unvermeidbar war, konnte in allen Versuchsgruppen eine nahezu stabile Einstellung eines physiologischen pH-Wertes beobachtet werden. Maßgeblich an der pH-Homöostase war auch die Verwendung eines Bicarbonatpuffers in der Basis-Hämofiltrationslösung beteiligt, mit dessen Hilfe angefallene Säureäquivalente durch Umsetzung zu flüchtigem CO₂ und Wasser aus dem System entfernt werden konnten. Die extrazellulären Elektrolytkonzentrationen von Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Ionen konnten in allen vier Untersuchungsgruppen kontinuierlich in physiologischen Grenzen mit vergleichsweise geringen Schwankungen innerhalb der jeweiligen Untersuchungsgruppe gewahrt werden, ohne dass das System manipulativen externen Einflüssen ausgesetzt war.

5.2 Galleproduktion

Der Gallefluss stellt einen wertvollen Parameter zur Beurteilung des Ausmaßes der ischämischen Leberschädigung eines Transplantates dar (Bowers et al., 1987). Gleichzeitig dient er als sensitiver Marker der Einschätzung der Transplantatfunktion (Sumimoto et al., 1988). Aufgrund der fehlenden Stimuli für die Gallesekretion liegt die Menge der produzierten Galle einer extrakorporal perfundierten Schweineleber mit $0,18 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht deutlich hinter der einer Schweineleber unter physiologischen Bedingungen mit $0,45 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Lebergewicht zurück (Mets et al. 1993). Den hormonellen Einflussfaktoren und Substraten des enterohepatischen Kreislaufs kommt somit entscheidende Funktion in der sekretorischen Leberfunktion zu, die in der Beurteilung der hepatischen Zellfunktionen unbedingt zu berücksichtigen ist (Gores et al., 1986). Während der Ischämiezeit sistiert die Galleproduktion, nach Einsetzen der Reperfusion bestimmt unter anderem der zelluläre ATP-Gehalt die Galleproduktion und -exkretion als energieabhängige Variablen (Kamiike et al., 1985). So wird die Abhängigkeit des Galleflusses von der Sauerstoffversorgung zur Bereitstellung von ATP erkennbar. Die ATP-Depletion im Lebergewebe nimmt mit Verlängerung der kalten Ischämiezeit zu, wobei hohe ATP-Spiegel rapide und so früh als möglich während der ersten Zeit der Organkonservierung abgebaut werden (Cywes et al., 1992). Dabei kann eine positive Korrelation der ATP-Depletion mit der Galleausscheidung angenommen werden (Karwinski et al., 1989). Morimoto und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch die Gabe von Insulin vor der Leberkonservierung höhere Spiegel an ATP in der Leber während der kalten Konservierung erzielt wurden, was nach der Transplantation mit höherer Galleproduktion einherging (Morimoto et al., 1996). ATP-Depletion führt in den Hepatozyten zu einer gesteigerten Aktivität der zytosolischen Proteasen (Dickson et al., 1992), dabei ist das Ausmaß der Proteolyse während der Transplantatkonservierung und während der Reperfusion mit Blut assoziiert mit der Transplantatdysfunktion (Aguilar et al. 1997), also u. a. mit einer verminderten oder sistierenden Gallesekretion. Die Wechselwirkung der schädigenden Einflüsse von warmer und kalter Ischämie auf die sekretorische Hepatozytenfunktion illustriert folgendes Beispiel. Bei Rattenlebern, die einer kurzen Kaltischämie ausgesetzt waren und dann für 45 Minuten wiedererwärmt wurden, betrug die Gallefluss $10,7 \mu\text{l}/\text{min}/\text{Leber}$, nach 18 Stunden Kaltischämie und einer Wiedererwärmungszeit von 20 Minuten konnte eine Galleexkretion von $5,4 \mu\text{l}/\text{min}/\text{Leber}$ gemessen werden (Vajdova et al., 2000). Der Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf das biliäre System der Leber ist allerdings

sehr komplex. Der Gallefluss wird auch entscheidend von der Integrität des Gallekanälchensystems beeinflusst. Der Protektion der biliären Mukosa kommt im Rahmen der I/R-Schädigung der Leber vielleicht eine entscheidende Bedeutung gerade im Hinblick auf die Entität der Gallenwegsstrikturen nach orthotoper Lebertransplantation zu (Wojcicki et al., 2008; Sharma et al., 2008). Die Schädigung des peribiliären Gefäßplexus ist hier von zentraler Bedeutung (Pirenne et al., 2008; Wojcicki et al., 2008). Die Gabe von Epoprostenol im Spenderorganismus wird als Maßnahme, die zu einer verbesserten Konservierung des peribiliären Gefäßnetzes und der Mukosa führt, zur Protektion vor Gallenwegsstrikturen empfohlen (Pirenne et al., 2009). Da alle mit Iloprost behandelten Gruppen besser in der Galleausscheidung abgeschnitten haben, könnte außerdem angenommen werden, dass der mögliche protektive Einfluss von Iloprost die Toxizität kalter Galle gegenüber dem Gallengangsepithel (Syrakos et al., 1979) abmildert. Anthuber et al. beschrieben in ihrer Arbeit über die Konditionierung von I/R-geschädigten Rattenlebern mit einem Prostazyklinanalogon auch die signifikant bessere Gallesekretion (Anthuber et al., 1996). Iloprost könnte einerseits zytoprotektiv die Zellschwellung und den Zelltod des Gallengangsepithels verhindern. Die vasodilatatorischen Eigenschaften von Prostazyklin wirken der Vasokonstriktion, ausgelöst durch z.B. chirurgische Intervention bei der Organexplantation und/oder durch die Kaltischämie während der HTK-Konservierung, besonders an den präkapillären Arteriolen entgegen, Shuntflüsse in der Leber werden minimiert und somit die bessere Redistribution des Blutflusses für die Versorgung mit Sauerstoff und nutritiven Metaboliten während der Reperfusion gewährleistet (Blumhardt et al., 1993). Diese Mechanismen mögen unsere Resultate erklären, dass eine durch Iloprost positiv beeinflusste Hämodynamik über die Verbesserung der Oxygenierung für eine bessere Funktionsleistung in Form der Gallesekretion verantwortlich ist. So lässt der bessere Gallefluss aller drei Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrolle vermuten, dass dies mit einem höheren zellulären ATP-Gehalt einhergeht (Kamiike et al., 1985), der aus der Prostaglandinwirkung resultieren könnte (Goto et al., 1992). Dabei ist zu erkennen, dass nur in der ersten Messung zur zweiten Stunde die Galleproduktion und -sekretion der spendervorbehandelten Gruppe nachhaltiger von der Iloprostgabe profitiert, jedoch zu jeder Messung über dem Niveau der Kontrollgruppe liegt. In der Gruppe 3 erreicht der Gallefluss nicht die Werte der Reperfusiongruppe, liegt aber ab der vierten Stunde vor den beiden anderen Untersuchungsgruppen. Die anhaltende Protektion von Iloprost, das in der Gruppe 3

während der HTK-Konservierung die Leber im Gegensatz zur Gruppe 2 besser erreicht haben könnte, gegen die Schädigung der Gallenwege durch hydrophobe Gallensalze (Hertl et al., 2000) während der 20stündigen Kaltischämie könnte dafür verantwortlich zeichnen. Wie Farkas et al. belegen, erhöht die Prostaglandinspendervorbehandlung den Gallefluss durch die verstärkte Ausscheidung von Gallensäuren und durch verbesserte Integrität der Gallengangsepithelien (Farkas et al., 2005). Dieser Protektionsmechanismus gegenüber der I/R-Schädigung der Leber könnte sich möglicherweise nachhaltiger in der Gruppe 3 und 4 gegenüber der spendervorbehandelten Gruppe in der vorliegenden Studie auswirken, was die initial bessere dann jedoch abfallende Galleausscheidung der Gruppe 2 im Vergleich erklärt. Die Spenderbehandlung der Gruppe 2 mit Iloprost während der Organexplantation ist durch die intraaortale Injektion nicht selektiv auf die Leber beschränkt, sondern ungerichtet. Hypothetisch kann für die Spendervorbehandlung angenommen werden, dass anders als in der Gruppe 3, wo durch die Zugabe zur HTK-Lösung das Ilomedin die Leber und auch die weiteren Bauchorgane gezielter erreicht, ein Teil des Prostazyklinanalogons hier die Leber aufgrund der Applikationstechnik verfehlt. In der Gruppe 3 mag der positive Effekt der Prostaglandingabe mit zunehmender Reperfusiondauer jedoch von den schädigenden Reperfusionmechanismen überwogen werden, wohingegen bei Dauerapplikation von Iloprost während der vulnerablen Phase der Reperfusion in Gruppe 4 die Protektion länger aufrechterhalten werden kann. Ein weiterer Grund für den niedrigeren Gallefluss in der Gruppe 2 und der Gruppe 3 gegenüber der Reperfusatgruppe ab der vierten Stunde der Reperfusion könnte der schädigende Effekt der Wiedererwärmung während der Reperfusion nach langer kalter Ischämie sein, der die sekretorische Hepatozytenfunktion gravierender zu alterieren scheint als die Kaltkonservierung (Vajdova et al., 2000). Hier scheint die I/R-Schädigung die Wirkung des Prostazyklins hinsichtlich der Optimierung der Hämodynamik und der Zytoprotektion nach der langen Zeit der Kaltischämie und der Reperfusion zu schmälern. Die über weite Strecken konstant hohe Gallesekretion der Gruppe 4, die zur vierten und sechsten Stunde sogar signifikant verbessert gegenüber der Kontrollgruppe ist, könnte auf eine weitaus beste Bereitstellung mit ATP schließen lassen (Shinohara et al., 1997). Die kontinuierliche Gabe von Iloprost in die Rezirkulation scheint, für die Dauer der gesamten Reperfusion einen positiven Einfluss auf die Funktion der Leber zu nehmen. So war die Gruppe 4 die am meisten galleproduzierende Untersuchungseinheit, wenn auch zum Ende nach acht Stunden nur

noch die Hälfte des Ausgangsniveaus produziert wurde. Insgesamt wird am Beispiel der Gruppe 4 der Zusammenhang der verbesserten Gesamtflussrate einhergehend mit besserer Oxygenierung und mehr Sauerstoffverbrauch (siehe nachfolgende Kapitel) und verbesserter Funktionsleistung durch Ilomedin mit seinem hohen vasodilatativen Potential am besten demonstriert.

Für alle Untersuchungsgruppen ist jedoch generell gerade im Hinblick auf die Beurteilung der Funktionsparameter anzumerken, dass die Lebensfähigkeit der Leber im extrakorporalen Kreislauf begrenzt ist und maßgeblich von den Untersuchungsbedingungen abhängt, die Lebensdauer unter „Normalbedingungen“ in der Maschinenperfusion wird mit u.a. von Gores und Mitarbeitern mit vier bis sechs Stunden beziffert (Gores et al., 1986). Vor diesem Hintergrund lässt sich die kontinuierliche Verschlechterung der Gallesekretion aller Untersuchungsgruppen über die achtstündige Reperfusionphase teilweise erklären, die auch der zytoprotektive Effekt von Prostazyklinanaloga nicht vollständig antagonisieren kann. Ein weiterer Faktor für die sinkende Galleausscheidung kann in der vermehrten Empfindlichkeit der Gallengangsepithelien gegenüber der Reperfusionsschädigung liegen (Noack et al., 1993). Im Laufe der fortschreitenden Reperusionszeit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass aktivierte Entzündungszellen wie polymorphkernige Leukozyten im Rahmen der I/R-Schädigungsmechanismen die duktale Basalmembran penetrieren und zur Schädigung des Gallenwegssystems beitragen (Carrasco et al., 1996). Dies kann wiederum durch Iloprost nachhaltig beeinflusst werden, wie die Resultate der Gruppe 3 und 4 in dieser Studie illustrieren. In früheren Studien zu I/R-geschädigten Lebern führte die jeweilige Spendervorbehandlung mit Prostaglandinen je nach Studienprotokoll zu deutlich verbesserter Galleproduktion im Vergleich zum unbehandelten Kontrollkollektiv (Farkas et al., 2005). In unserer Studie konnten wir eine deutliche Abstufung der produzierten Gallenmenge pro Zeit und auf 100 g Lebergewicht je nach Applikationszeitpunkt des Iloprosts feststellen, wie es bisher in der Literatur nicht beschrieben ist.

5.3 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch als Ausdruck zellulärer, differenzierter Stoffwechselaktivität stellt keinen charakteristischen hepatischen Funktionsparameter dar. Die Mitochondrien sind die Zellorganellen, die zur ATP-Generierung mittels oxidativer Phosphorylierung, Sauerstoff verbrauchen. In den Zellen der Leber als sehr stoffwechselaktives Organ

nehmen die Mitochondrien bis zu 25 % des Zellvolumens ein. Der Sauerstoffverbrauch dient somit indirekt zur Evaluierung der mitochondrialen und somit der Stoffwechselfunktion der Hepatozyten und der gesamten Leberfunktion nach I/R-Schädigung. Im Gegenzug führt I/R-bedingter oxidativer Stress zur mitochondrialen Dysfunktion, die zu irreversibler Zellschädigung und dem Zelltod führen kann (Broekemeier et al., 1992). Der niedrige Gehalt an ATP nach verlängerter kalter Ischämie durch Dephosphorylierung von energiereichen Nukleotiden (Nishida et al., 1987) ist ein Hauptproblem, das die frühe Erholung der Organfunktion nach einer Ischämie limitiert. So wird angenommen, dass durch einen erhöhten Sauerstoffgehalt im Lebergewebe während der Ischämiephase die Schädigung der Hepatozyten in der Reperfusion abgeschwächt wird und so zu einer schnelleren Wiederherstellung der Leberfunktion führt (Hiratsuka et al., 2000).

Septische Patienten mit einem hohen Gewebesauerstoffdefizit bei hoher Sauerstoffschuld, wie sie vergleichbar auch in der postischämische Reperfusionsphase zu finden ist, profitieren von der PGI₂-Gabe, so dass sich diese Schuld teilweise umkehrt (De Backer et al., 1992). In gesunden Probanden konnte die PGI₂-Infusion den hepatischen Blutfluss um 41% steigern (Hassan, Pickles, 1983). Ob die erhöhte Bereitstellung von Sauerstoff bei verbesserter Sauerstoffverfügbarkeit die aerobe Glucoseoxidation im Gewebe fördert und damit der Generierung von energiereichen Phosphaten dient, bleibt strittig. Tatsächlich führt aber die verbesserte Sauerstoffverfügbarkeit im Gewebe durch Gabe von PGI₂ zur Steigerung sauerstoffabhängigen Stoffwechsels bei kritisch kranken Patienten (Bihari et al., 1987). Die erhöhte Sauerstoffaufnahme spiegelt indirekt also auch das Ausmaß energieproduzierender Zellvorgänge, also der ATP-Produktion, wider. Prostaglandine können eine vorbestehende Gewebhypoxie teilweise korrigieren und den Zellen durch verbesserte Sauerstoffversorgung die Gewinnung von energiereichen Phosphaten ermöglichen. So könnten die ATP-Level im Lebergewebe zum Reperfusionszeitpunkt bspw. zur Vorhersage der initialen Transplantatfunktion herangezogen werden (Gonzalez et al., 1994). In einigen Studien ist die Sauerstoffinsufflation als vorteilbringende Methode zur Aufrechterhaltung der Gewebe-ATP-Level und damit zum besseren Qualität der konservierten Transplantatleber eingesetzt worden (Minor et al., 1998). Der Sauerstoffverbrauch der extrakorporal perfundierten, ischämisch nicht geschädigten Schweineleber unter idealen Voraussetzungen liegt bei 2,5 ml O₂/100 g Lebergewicht/min (Mets et al., 1993). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten

Ergebnisse liegen in ihrer Größenordnung zwei Zehnerpotenzen unter diesem Wert. Dennoch sieht man klar die beste Sauerstoffversorgung in der Reperfusiongruppe. Die Sauerstoffkonzentration verhält sich zu allen dargestellten Messzeitpunkten entweder zu der Kontrollgruppe und der Gruppe 3 oder gar im letzten Reperusionsabschnitt zu den drei anderen Untersuchungsgruppen signifikant verhält. Zudem bleibt der Sauerstoffverbrauch der Gruppe 4 auf nahezu konstant hohem Niveau während der gesamten achtstündigen Reperfusion, wohingegen bei der Gruppe 2 ein zunehmender Abfall des Sauerstoffverbrauchs zu sehen ist. Der gleichbleibende oder leicht ansteigende Verbrauch an Sauerstoff in allen Versuchsgruppen in den ersten vier Stunden in der Maschinenperfusion könnte durch den erhöhten Bedarf bedingt durch die postischämische Sauerstoffschuld verursacht sein (Winkler et al., 1985). Die Prostaglandingabe zum Zeitpunkt der Explantation und der extrakorporalen Reperfusion von Schweinelebern könnte zu einer Vergrößerung der Energiereserve im entsprechenden Organ führen, was die gute Verfügbarkeit von Sauerstoff voraussetzen würde. Im klinischen Kontext ist bei der Prostazyklingabe im Empfängerorganismus nach einer Lebertransplantation eine verbesserte hepato-venöse Sauerstoffsättigung in Anlehnung an die Resultate vorhergehender Tierexperimente beschrieben worden (Neumann et al., 2000), was durch Verbesserung der Mikrozirkulation in hypoxischen Leberarealen erreicht werden könnte. Das Endothel selbst als zentraler Regulator des Blutflusses eines Organs kann auf verminderte Sauerstoffgewebespannung nach I/R und Scherkräfte, wie bei z.B. im Rahmen der Reperfusion auftretend, mit stimulierter Produktion an Prostazyklin reagieren (Soler et al., 1997). So imitiert und potenziert das Behandlungskonzept der Gruppe 4 die physiologische, sinnvolle Antwort des Endothels auf die stattgehabte I/R-Schädigung, um einerseits die Gewebeversorgung mit Sauerstoff zur Energiebereitstellung zu sichern und andererseits größtmöglichen Schaden durch die wiedereinsetzende Perfusion (bspw. Scherkräfte) zeitgleich zu minimieren.

So haben Studien den wertvollen Effekt der Prostaglandinvorbehandlung auf den Energiemetabolismus der konservierten Leber, der teils mit einem verbesserten Überlebenschancen des Transplantats verbunden war, im Vergleich zur nichtbehandelten Kontrollen zeigen können (Goto et al., 1993; Helling et al., 1995), sind jedoch den direkten Vergleich zur Behandlung der Reperusionsgruppe schuldig geblieben. Mit der Phase der Reperfusion ist das schon durch die Kaltischämie geschädigte Endothel zusätzlich den Fluss- und Druckkräften des Reperusates

ausgesetzt. Wie Tierexperimente gezeigt haben, spielen die ersten Minuten der Revaskularisation die entscheidende Rolle für die Entwicklung des I/R-Schadens der Leber (Post et al., 1992), was die zentrale Rolle der Endothelfunktion in dessen Ausbildung nur unterstreicht. Die Überlegenheit der Reperfusatgruppe hier, gezeigt am Sauerstoffverbrauch der Leber als Marker für einen funktionierenden Zellmetabolismus, kann eventuell durch die beste Endothelzellintegrität und -funktion bedingt sein (Pannen et al., 2002). So weisen Olthoff und Mitarbeiter zwar nach Prostaglandinbehandlung während der Reperfusionsphase in den Lebertransplantaten von Ratten einen verminderten I/R-Schaden nach, konnten jedoch weder einen Zusammenhang zum Sauerstoffverbrauch noch zu hämodynamischen Parametern zugunsten der prostaglandinbehandelten Gruppe herstellen, so dass die hier formulierten Hypothesen in den untersuchten Parametern dort keine Bestätigung finden (Olthoff et al., 1991).

Durch die Präsenz von Iloprost wird in der Gruppe 4 die gestörte Balance der hepatischen Mikrozirkulation (Kobayashi et al., 1995) als Schlüsselmechanismus wiederhergestellt. Der Effekt der optimierten Sauerstoffausschöpfung ist sowohl Voraussetzung als auch Folge einer besseren Organvitalität und -funktion (siehe Galleausscheidung, Kap. 5.2). Die vasodilatative Iloprostwirkung kommt im Behandlungskonzept des Empfängers am effektivsten zum Tragen. Die Spendervorbehandlung kurz vor dem Start der HTK-Kaltperfusion könnte wegen ihrer ungerichteten intraaortalen Gabe und der mit der nur kurzdauernden „Einwirkzeit“ verbundenen Limitierung der Prostaglandinwirkung und der darauffolgenden langen Phase der Kaltischämie der Reperfusatbehandlung hier unterlegen sein. Die relativ kurze Halbwertszeit von Iloprost macht die Gruppen 2 und 3 der konstanten Dauergabe in der Gruppe 4 unterlegen. Die Behandlungsgruppe 3 könnte den Nachteil haben, dass die Zugabe zur vasokonstringierenden kalten HTK-Lösung teilweise auf die optimale Distribution von Iloprost in der Leber zur maximalen Wirkungsentfaltung behindert.

Die Wiederherstellung des Blutflusses in der postischämischen Leber ist essentiell für die Wiederaufnahme sämtlicher Zellfunktionen, andererseits werden dadurch Substrate zur Verfügung gestellt und Mechanismen in Gang gesetzt, die den eigentlichen Ischämie/Reperfusionsschaden erst bedingen oder potenzieren (Clavien et al., 1992). Von aktivierten Kupffer-Zellen, Makrophagen und Hepatozyten werden in der Reoxygenierung freie Sauerstoffradikale freigesetzt (Jaeschke, Farhood, 1991). Sauerstoffradikale werden in erster Linie aus anoxiebedingten Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette generiert (Dawson et al., 1993). Hauptsächlich

Superoxid-, Hydroxyl- und Hydrogenperoxidradikale schädigen Proteine, Enzyme, Nukleinsäuren, das Zytoskelett und Zellmembranen und führen darüber zu einer Beeinträchtigung und zur Zerstörung Mitochondrienfunktion und zur Lipidperoxidation (McCord 1985). Schädigung der Endothelien und der Hepatozyten endet im Verlust der mikrovaskulären Integrität und in vermindertem Blutfluss durch Apoptose (Rauen et al., 1999). Diese Mechanismen spiegeln die Ambiguität der Sauerstoffgabe wider und könnten teilweise die niedrigen Werte im Sauerstoffverbrauch der Lebern in dieser Studie im Vergleich zu unbeeinträchtigten Schweinelebern und den fortschreitenden Abfall des Sauerstoffverbrauches als Ausdruck des Funktionsverlustes mit zunehmender Perfusionszeit erklären. Protektive antioxidative Substanzen zum Schutz vor Sauerstoffradikalen stellen z. B. Glutathion (GSH) und Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) dar. Viele zelluläre Kompensationsprodukte wie Glutathion benötigen zur Regeneration ATP, ein Umstand, der die Zellen doppelt anfällig für I/R-bedingte Schädigung macht.

5.4 Harnstoffsynthese

Die Harnstoffsynthese stellt eine wichtige hepatozelluläre Stoffwechselfunktion in der Entgiftung von Ammoniak und in der Metabolisierung anderer Stickstoffverbindungen dar, weshalb sich Harnstoff zur Einschätzung der Funktion von I/R-geschädigten Lebern eignet. In der Literatur findet man wenige Angaben zur Harnstoffsyntheseleistung als Indikator einer suffizienten Leberfunktion nach Transplantationen. In der vorliegenden Studie konnte die nichtbehandelte Kontrollgruppe die höchste Harnstofffreisetzung zu den ersten drei Messpunkten während der Reperfusion vorweisen, wobei die Gruppe 4 stets nur geringfügig niedrigere Werte aufwies. Zur letzten Messung nach acht Stunden wurde von der Reperfusatgruppe die höchste Konzentration an Harnstoff freigesetzt. Zu keinem Zeitpunkt bestanden jedoch signifikante Unterschiede im direkten Gruppenvergleich. Die Harnstoffkonzentrationen aller Gruppen konnten am Ende der Reperfusionsphase auf das Vier- bis Fünffache ihrer Ausgangswerte am Perfusionsbeginn gesteigert werden. Die Gruppe 4 erreichte hier wiederum die besten Resultate, was die Konditionierung der hepatischen Funktionsleistung durch dieses Behandlungskonzept unterstreicht.

Im Intervall zur zweiten und dritten Messung waren die größten dynamischen Entwicklungen in der Harnstoffsynthese zu beobachten. Die hohen Werte der Kontrollgruppe, die deutlich über dem Niveau der nahezu gleichen Werte für die Gruppe

2 und 3 liegen, konterkarieren die bisherigen Resultate der Funktionsparameter. Auch der stetige Anstieg der Harnstoffkonzentration bis zum Ende der achtstündigen Reperfusion weist auf eine verbesserte Stoffwechselleistung mit zunehmender Perfusionszeit hin, was nach der langen Phase der Kaltischämie umso beachtlicher ist. Die Hypothese der zunehmenden Freisetzung des Harnstoffs aufgrund des vermehrt auftretenden Zelluntergangs von Hepatozyten könnte im Hinblick auf die hohen Harnstoffkonzentrationen der Kontrollgruppe diskutiert werden.

5.5 Glucosestoffwechsel

Hinsichtlich des Glucosestoffwechsels, der im Organismus vielfältigen, sich wechselseitig bedingenden oder ausschließenden Einflüssen unterliegt, können aus den Daten der isoliert extrakorporal perfundierten Leber in der Maschine nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Leberfunktion gezogen werden (Adham et al., 1997). Die Leber als das wichtigste Stoffwechselorgan ist natürlich auch während der extrakorporalen Perfusion in der Lage, die Glucosehomöostase zu regulieren (Craig 1966). Die Leber besitzt neben der Niere die Schlüsselenzyme zur Gluconeogenese, um aus Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen wie Lactat, Glycerin oder glucogenen Aminosäuren Glucose neu zu synthetisieren. Hepatozyten sind die wichtigsten Zellen des Körpers für die Gluconeogenese. Die Energiebilanz der Gluconeogenese fällt jedoch negativ aus, so dass 3 mol ATP/Mol gebildeter Glucose verbraucht werden, niedrige ATP-Spiegel hemmen daher die Gluconeogenese. Die extrakorporal perfundierte Leber generiert in der ersten Stunde nach Beginn der Reperfusion jedoch bereits aus Lactat Glucose (Krebs 1974). Die Gluconeogenese ist eng mit dem Harnstoffzyklus verbunden.

Gleichzeitig kann die Glucosehomöostase durch die Regulation des Glykogenstoffwechsels (Synthese oder Abbau) gewährleistet werden.

Die Angabe der Glucose der einzelnen Versuchsgruppen erfolgte nicht als Absolutwert der Konzentration sondern relativ zur Konzentration während der Präperfusion. Initial sahen wir in allen Versuchsgruppen deutlich erhöhte Werte (Adham et al., 1997), wobei hier sowohl die Gruppe 1 wie die Gruppe 2 höhere prozentuale Abweichungen zeigen als die anderen beiden Gruppen. Am wahrscheinlichsten ist der Anstieg durch den verstärkten Glykogenabbau während der Ischämiezeit zu erklären. Nach vier Stunden der Reperfusion sind die Werte in allen Gruppen auf ca. die Hälfte des postischämischen Ausgangsstatus abgefallen. Auffällig ist hier und in den folgenden

Messungen der deutliche Abfall der Gruppe 3. Die Gruppe 2 kann im Verlauf die beste Glucosefreisetzung im Vergleich zur Präperfusion vorwiesen, was vielleicht durch eine gesteigerte Gluconeogenese bedingt sein könnte. Signifikanzen zu den anderen Gruppen traten jedoch zu keinem Zeitpunkt auf. Sicherlich nur sehr eingeschränkt zu werten, fällt jedoch das Zurückbleiben der Gruppe 3, selbst gegenüber der Kontrollgruppe auf.

5.6 Hämodynamik

5.6.1 Makrohämodynamik

Die Erhaltung eines adäquaten hepatischen Blutflusses ist von entscheidender Bedeutung für die Homöostase der Leber. So sind die ersten Minuten der Revaskularisation entscheidend in der Entwicklung eines I/R-Schadens in der Transplantatleber (Post et al., 1995), dabei kann eine verzögerte Wiederherstellung der arteriellen Blutzufuhr verstärkt mikrovaskuläre Störungen hervorrufen, die dann zu einer Transplantatdysfunktion führen können, was aus der additiven Aggravierung der schon vorbestehenden Hypoxie im Rahmen der Ischämie erklärt werden könnte (Puhl et al., 2004). Die duale Blutversorgung der Leber bestimmt die Verteilung des Blutflusses, moduliert durch die Möglichkeit der arteriellen Kompensation einer Flussänderung in der Portalvene von bis zu 60 % (Lautt et al. 1990). Der intrahepatische Blutfluss dagegen wird von vasokonstriktiven Substanzen wie Endothelin (ET) und vasodilatativen Agenzien wie z.B. NO im Gleichgewicht gehalten, die über den Tonus der Gefäßwände der afferenten terminalen hepatischen Arteriole und der afferenten terminalen portalen Venole sowie über die Sinusoide selbst die Mikrozirkulation beeinflussen (Pannen 2002). Wesentliche Merkmale der hepatischen I/R-Schädigung wie Hypoxie und Zelluntergang resultieren aus der Malperfusion der Sinusoide, deren hämodynamische Zustände sich in die variablen Eigenschaften der Makrozirkulation fortpflanzen und dort widerspiegeln (Pannen 2002).

Durch Prostazyklin werden der periphere Gefäßwiderstand und der mittleren arterielle Blutdruck vermindert und die hepatische Sauerstoffversorgung verbessert. Die Vorbehandlung von Schweinelebern mit Prostaglandin E₂ verhinderte die rapide intrazelluläre ATP-Depletion in der ischämischen Phase zwar nicht, die Wiederherstellung der ATP-Speicher in der Reperusionsphase war unter der Behandlung jedoch signifikant besser (Helling et al., 1995), was sicherlich der verbesserten Hämodynamik und Sauerstoffversorgung geschuldet sein dürfte.

Die initiale Perfusionsqualität der extrakorporal perfundierten Leber muss sowohl als Antwort auf den erlittenen Ischämie/Reperfusionsschaden als auch auf dessen Modifikation durch Iloprost in den Behandlungsgruppen verstanden werden kann. Mit zunehmender Perfusionsdauer kann im Modell der achtstündigen extrakorporalen Maschinenperfusion jedoch anhand der Hämodynamik das fortlaufende Organversagen bei stattgehabtem Konservierungs- und Reperfusionsschaden gesehen werden, der sich von der Mikro- zur Makrozirkulation fortpflanzt. Sehr lange Ischämiezeiten von 24 Stunden führen zu schwerwiegenden Störungen in der Mikrozirkulation (Post et al., 1993).

Im postischämischen Lebergewebe werden die Perfusionseigenschaften von einem erhöhten Perfusionswiderstand bestimmt, der hervorgerufen wird durch die hypoxische Zellschwellung von Endothelien und Nicht-Endothelzellen. Zusätzlich führen die verstärkte Leukozytenadhärenz und deren transendotheliale Migration ins umgebene Leberparenchym (Vollmar et al., 1994), die Hämokonzentration und die Imbalance zugunsten von Endothelin gegenüber NO zur Stagnation des sinusoidalen Blutflusses. Im Folgenden müssen die Untersuchungsergebnisse auch unter dem Gesichtspunkt der Störung der Autoregulation nach Leberdenervation während der Hepatektomie, die erhebliche Perfusionsungleichheiten hervorrufen kann, betrachtet werden (Schemmer et al., 1999).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann geschlussfolgert werden, dass der vasorelaxierende Effekt von Iloprost vornehmlich in den ersten vier Reperfusionstunden zur Verringerung des Gefäßwiderstandes der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe beiträgt. Diese Wirkung relativiert sich in unserer Studie zum Ende der Reperfusion, so dass der periphere Gefäßwiderstand nach acht Stunden fast keinerlei Gruppenunterschied aufweist. Der periphere Gefäßwiderstand wurde als Ausdruck des I/R-bedingten Leberschadens gewertet, was die Abhängigkeit der Organdurchblutung von den Widerstandsbedingungen in Zusammenhang mit der Organfunktion verdeutlicht. Zu Beginn der Perfusion waren tendenziell leicht verbesserte Widerstandswerte in den Gruppen 2 und 3 zu sehen. Signifikanzen traten allerdings nicht auf. Es gilt als erwiesen, dass I/R-Schädigung zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes führt. So steigt der arterielle Gefäßwiderstand während der Reperfusion nach verlängerter kalter Ischämiezeit an (Imamura et al., 1997). Oldhafer et al. stellten in ihrem Schweinelebertransplantationsmodell fest, dass der arterielle Gefäßwiderstand nach vier bis sechs Stunden Kaltischämie fiel,

wohingegen der portalvenöse stieg. Die Möglichkeit der Eröffnung präformierter Shuntflüsse und die wechselseitige Abhängigkeit der arteriellen und der portalvenösen Hämodynamik wurden als Erklärungsversuche ins Feld geführt (Oldhafer et al., 1993). Auch in unserem Modell könnte diese Hypothese den Abfall des von uns gemessenen arteriellen peripheren Widerstandes erklären, der durch die vasodilatative Wirkung der Iloprostvorbehandlung in den Gruppen 2 und 3 auffällt. In der Reperfusionstherapiegruppe könnte die Iloprostwirkung auf den arteriellen Gefäßwiderstand dagegen erst mit dem zweiten Messpunkt zu detektieren sein. Die Ursachen für die hämodynamischen Veränderungen, nach denen der Widerstand der hepatischen Arterie als Marker der I/R-Schädigung gilt, sind jedoch nicht ausschließlich auf die biochemischen und vasomotorischen Gefäßreaktionen, wie von Eisele et al. postulieren (Eisele et al., 2001), zu reduzieren. Ohne Frage spielen Neutrophile und andere immunologische Zellen im Modell der isolierten extrakorporalen Perfusion vielleicht eher eine untergeordnete Rolle, da allerdings bspw. in der Rattenleber 39% der nonparenchymalen Zellen Kupffer-Zellen als residente Makrophagen darstellen (Decker 1990), und das Perfusat in unserem Perfusionskreislauf auch Leukozyten als Bestandteil des allogenen Schweinebluts enthielt, dürfen diese Mechanismen der hämodynamischen Beeinflussung nicht völlig außer Acht gelassen werden. So konnten von Frankenberg et al. zeigen, dass Kupffer-Zell-depletierte Schweinetransplantatlebern eine deutlich verbesserte Mikro- und Makrohämodynamik mit deutlicher Betonung des verbesserten arteriellen Blutflusses vorweisen konnten, was mit einer verbesserten frühen Transplantatfunktion und der Verhinderung von Transplantatdysfunktion oder -versagen einherging (von Frankenberg et al., 2003).

Der Gesamtperfusatfluss pro Zeit lag zu allen Messpunkten in der Reperfusionstherapiegruppe am höchsten, wobei der Anteil der Arterie am Gesamtfluss von allen Gruppen der niedrigste war und im Verlauf der Reperfusion kontinuierlich abnahm. Dagegen erreichte der arterielle Anteil an der Gesamtperfusion in der Gruppe 3 zu allen Messzeitpunkten die höchsten Werte, und zur zweiten, sechsten und achten Stunde sogar Signifikanzniveau gegenüber allen anderen Gruppen. Eine gesteigerte Gesamtflussrate des Perfusats in der Arteria hepatica im extrakorporalen Maschinenkreislauf, wie in der Gruppe 3 gesehen, kann zur Verbesserung der postischämischen Leberfunktion beitragen, wohingegen unphysiologisch hohe portalvenöse Drücke einen schädlichen Effekt bewirken können (Blumhardt et al., 1993). Dagegen konnten Puhl et al. 2005 belegen, dass die sinusoidale Hyperperfusion als Reaktion auf einen I/R-Schaden einen

Schutzmechanismus darstellt. Die inverse Korrelation zu den freigesetzten Transaminasen und Bilirubinspiegeln diene hier als Beweis (Puhl et al., 2005). Neben einer potentiell schädlichen Wirkung einer portalen Hyperperfusion, wie von Fraser et al. (Fraser et al., 1980) behauptet, führt die dadurch verursachte Erhöhung der vaskulären Scherkräfte zur Vermittlung von Zellproliferation und zytoprotektiven Mechanismen wie der NO- und Prostaglandinausschüttung (Schoen Smith, Lautt, 2005).

Die erhöhte Flussrate in der Arteria hepatica in der Gruppe 3 könnte die vergleichsweise gute Gallesekretion der Gruppe 3 zu den letzten drei Messpunkten erklären. Wie schon in dem vorangegangenen Abschnitt zur Bewertung des Versuchsaufbaus muss für alle Gruppen prinzipiell eine konzeptionelle portalvenöse Hyperperfusion angenommen werden, die zur Schädigung der nachgeschalteten Perfusionsbezirke beitragen könnte.

Iloprost, in den Reperfusionskreislauf (Gruppe 4) verabreicht, kann durch die Verbesserung der rheologischen Eigenschaften des Perfusats den vermehrten Gesamtgewebefluss bewirken. In der Gruppe 3 dagegen fällt der Gesamtperfusatfluss von allen 4 Untersuchungsgruppen zu sämtlichen Messzeitpunkten am niedrigsten aus. Der prozentuale Anteil der arteriellen Perfusion dagegen ist gefolgt von der Gruppe 2 der höchste aller Gruppen. So kann diskutiert werden, ob sowohl die Spendervorbehandlung als auch die Modifizierung der Konservierungslösung im Vorfeld der Entwicklung von agonalen, durch diverse Reize ausgelöste Vasospasmen der Arteria hepatica entgegenwirken (D'Alessandro et al., 1989), ein Effekt, der in der Reperfusatgruppe fehlt oder erst später auftreten könnte. Hier jedoch ist das Perfusionsverhältnis von Anfang an zugunsten der portalvenösen Versorgung verschoben, und gemäß der „Pufferfunktion“ der Leberarterie scheint der arterielle Versorgungsarm hier paradoxerweise trotz der Iloprostgabe gedrosselt zu sein, um die Organintegrität und -funktion nicht zusätzlich zu schädigen (Henderson et al., 1992).

Der portalvenöse Fluss macht physiologischerweise 75 % des Gesamtblutflusses der Leber aus, die Sauerstoffverbrauch des Lebergewebe wird unter Normalbedingungen jedoch zu 50 % von arterieller Versorgungsleistung abgedeckt (Campra, Reynolds 1988). Womöglich ist eine Erklärung auf der sinusoidalen Ebene zu finden, da der wesentliche Ort der Regulation des Blutflusses die Sinusoide selbst sind. Die oben beschriebenen Störungen der Mikroperfusion im Rahmen der I/R-Schädigung könnten durch die kontinuierliche Iloprostapplikation in der Gruppe 4 wirksam behandelt werden,

so dass der sinusoidale Widerstand verringert und so der portale Fluss verbessert wird. Die Wiederherstellung der Gefäß- könnte die Rekonstitution der Gewebshomöostase nach sich ziehen. Wiederum könnte man im Gruppenvergleich schlussfolgern, dass eine suboptimale Verteilung und/oder die kurze Wirkperiode wahrscheinlich dafür verantwortlich sind, dass nachhaltige Effekte der Iloprostvorbehandlung hier ausbleiben. So kann die Reperfusionstherapie trotz des geringeren Anteils der arteriellen Blutversorgung verbunden mit reduzierter Sauerstoffbereitstellung dennoch den höchsten Sauerstoffverbrauch und damit die beste Galleausscheidung erreichen. Für die Gruppen 1-3 muss zudem die Möglichkeit diskutiert werden, dass die arterielle Gefäßversorgung zugunsten der besseren Sauerstoffverfügbarkeit im Rahmen vaskulären Autoregulation teils unabhängig der medikamentösen Beeinflussung durch Prostaglandin eine Rolle im Verteilungsmuster der Makroperfusion spielt (Gelman, Ernst 1977). Andererseits können der erhöhte Sauerstoffverbrauch und die hohe Gesamtflussrate der Tatsache geschuldet sein, dass die Gruppe 4 im Gegensatz zu den vorbehandelten beiden anderen Gruppen ähnlich der Kontrollgruppe keine Protektion gegen den Ischämieschaden erhalten hat, so dass die verbesserte Makrohämodynamik und der gesteigerte Sauerstoffverbrauch den sauerstoffabhängigen Reparaturprozessen eines lebensfähigen Organs nach ischämischer Schädigung Rechnung tragen (Kitai et al., 1995). Dies würde durch den positiven vasodilatativen Einfluss von PGI_2 auf die Mikrozirkulation und die Zytoprotektion im Gegensatz zur Kontrollgruppe noch verstärkt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie konnten Wolf et al. die Veränderungen der Makrohämodynamik und des Sauerstoffverbrauchs nur in den ersten 30 Minuten der Reperfusion bei kontinuierlicher Epoprostenolgabe nach einer Stunde der Warmischämie in der Schweineleber konstatieren (Wolf et al., 1998). Harada et al. diskutierten, dass der Benefit von niedermolekularem Heparin als auch von Antithrombin III auf die Reduzierung des hepatischen I/R-Schadens, mit Erhöhung des Blutfluss im Lebergewebe, der damit verbundenen reduzierten Transaminasenfreisetzung und die verminderten hepatischen MPO-Aktivität, auf die Förderung der Freisetzung von PGI_2 aus dem Endothel zurückzuführen sei (Harada et al., 2006). Die Agenzien wurden jeweils vor der Ischämie- respektive Reperusionsphase verabreicht. Diese Ergebnisse sahen wir in unserer Studie im Gesamtblutfluss der Gruppe 2 gegenüber der Kontrollgruppe, in der Hämodynamik der Arteria hepatica sowie im peripheren Gesamtwiderstand der Gruppe 2 und 3 bestätigt.

Auch andere Studien belegen den verbesserten hepatischen Blutfluss durch die Gabe von Prostaglandinen, der verbunden mit einer besseren Transplantatlebensfähigkeit zu sein scheint. Dabei führte die intraportale Prostaglandin E₂-Gabe im Schwein, die einmal im Vergleich zur intravenösen Applikation und einmal zwei Stunden nach Gefäßanastomosierung im orthotopen Transplantationsmodell erfolgte, zur Steigerung des Flusses der Arteria hepatica und des Gesamtgewebeflusses (Kawachi et al., 1997). In der Arbeit von Hossain et al. dagegen konnte die intraportale PGE₂-Infusion vor und nach der Ischämieepisode den portalvenösen Fluss signifikant steigern, was mit der Zunahme des peripheren Gewebeflusses gekoppelt war, die wiederum die Schädigung im Rahmen der Ischämie/Reperfusion und Hepatektomie beschränkt (Hossain et al., 1999). Beide Studienprotokolle belegen die auch in der vorliegenden Studie gezeigte Überlegenheit der Empfängerbehandlung.

Abschließend ist beachtlicher Weise anzumerken, dass in der Kontrollgruppe der Gesamtperfusatfluss zwar wie erwartet eher hinter den anderen Gruppen zurückfällt. Auch der periphere arterielle Gefäßwiderstand bewegt sich nahezu konstant auf dem höchsten Niveau, dennoch werden Gesamtflussraten, die jenseits eines kompletten Organausfalls liegen, erreicht, die mit einer akzeptablen Gewebepfusion im Rahmen des erlittenen I/R-Schadens einhergehen. Unterstützend zu dieser Beobachtung kann hier angemerkt werden, dass der Gefäßverschluss der Leber während elektiver Resektionen zur Reduktion des Blutverlustes im Vergleich zum intermittierenden Verfahren zu keiner erhöhten Mortalität und keiner erhöhten Inzidenz an Leberversagen oder anderen Morbiditäten führt, wie man es im Zuge der I/R-Schädigung mit vergesellschafteten Komplikationen wie der Leberdysfunktion hätte erwarten können (Gurusamy et al., 2009).

5.6.2 Mikrozirkulation

Die postischämische Reperfusion in der Leber ist untrennbar mit dem Versagen der nutritiven Perfusion trotz Wiederherstellung des Blutflusses und der ungenügenden Energiebereitstellung für die wiedereinsetzende Organfunktion verbunden. Die Verhinderung und/oder Eindämmung des mikrozirkulatorischen Ausfalls kann dabei den Grad der hepatozellulären Schädigung maßgeblich modulieren. So korreliert bspw. die visuelle Evaluierung großer Perfusionsheterogenitäten postischämischer Lebern während der Transplantation oft mit einer frühen schlechten Organfunktion und dem klinischen Gesamtoutcome (Menger, Vollmar 2000).

Die hepatische Mikrozirkulation umfasst den Bereich der terminalen Gefäße, Arteriolen und portale Venulen, die nach wiederholter Aufzweigung mit einem Durchmesser von 15-35 μm und einer Länge von 50-70 μm in die Sinusoide münden (Oda et al., 2003), wo der Stoff- und Gasaustausch mit dem umgebenden Gewebe stattfindet. Die Fließeigenschaften des Perfusates und die Fließbedingungen im Gefäßsystem bestimmen die Mikrozirkulation. Daraus leitet sich der dynamische Aspekt und temporäre Charakter in der Einschätzung der Mikrozirkulation ab, wobei die zeitliche Abfolge der Mechanismen während der I/R-bedingten Schädigung teils abgebildet werden (Cutrin et al., 2002). Während in gesunden Lebern eine nahezu homogene Gewebepfusion zu finden ist, bestimmt eine ausgeprägte heterogene Mikrozirkulation das Bild der perfundierten Leber nach einer Lebertransplantation. So konnten Mehrabi et al. nachweisen, dass erst 72 Stunden nach der Reperfusion eine wenn auch reduzierte, homogene Mikrozirkulation in der Leber festzustellen war. Nach Einschätzung der Autoren erlaubt die Messung der Mikrozirkulation einzelner Leberregionen, hier über die Thermodiffusion durchgeführt, keine valide Aussage zur Gesamtperfusionsqualität in den ersten 24 Stunden der Reperusionszeit nach Lebertransplantation, gezeigt im Schweinelebermodell (Mehrabi et al., 2003). Die Messung des tiefen Flusses erfolgte zu jedem der drei Messzeitpunkte an einer anderen Stelle der Leberparenchymoberfläche. Wie zuvor schon dargelegt unterliegt die hepatische Mikrozirkulation während der ersten Zeit der Reperfusion großen Schwankungen mit einer enormen Variationsbreite in der Heterogenität der Leberdurchblutung sowie einem ausgeprägten zeitlichen Einfluss. Aus der Auswertung der gezeigten Flussmuster könnte jedoch ein Trend hinsichtlich der gesamten Perfusionsqualität der einzelnen Untersuchungsgruppen aus der mikrohämodynamische Beeinflussung durch Iloprost abgeleitet werden. Die Messung der tiefen Gewebeflusseigenschaften erfolgte in acht mm Tiefe. Mehrabi et al. führen die frühe Homogenisierung der horizontalen Flüsse und die vorrangige Wiederherstellung des Blutflusses besonders in den kranialen Schichten als charakteristisch für die frühe Phase der postischämischen Reperfusion auf (Mehrabi et al., 2003). Wir sahen zur vierten und achten Stunde die besten tiefen Flusswerte für die Gruppe 4, was den direkten positiven vasodilatativen Einfluss von Iloprost auf die Mikrozirkulation unterstreicht. Die anderen beiden Behandlungsgruppen zeigten nach vier Stunden gegenüber der Kontrollgruppe keine Verbesserung des tiefen Flusses. Nach acht Stunden wiesen alle Behandlungsgruppen bessere tiefe Flussraten als die

Kontrolle auf. Als Resümee kann auch hier die Konditionierung der Durchblutung, im speziellen der Mikroperfusion als Folge der Iloprostwirkung mit einer optimierten Oxygenierung, dem vermehrten Sauerstoffverbrauch und der damit einhergehenden gesteigerten Funktionsleistung diskutiert werden. Wie schon gezeigt wiederholt sich auch am Beispiel der Mikrozirkulation in den gezeigten Werten der vorliegenden Studie die Rangfolge der Behandlungsgruppen.

5.7 Makroskopie-Score und Gewichtsdifferenz

Zu Beginn der Reperfusion waren keine Abweichungen im Gruppenvergleich hinsichtlich der makroskopischen Beschaffenheit zu beobachten. Mit zunehmender Reperfusionsdauer ab der zweiten Stunde fiel die Kontrollgruppe jedoch durch die höchsten Scorewerte auf. In den Behandlungsgruppen sahen wir eine Abstufung, die sich bis zum Ende der Reperfusion verfolgen ließ, nach der die Gruppe 2 den niedrigsten, also besten Index, gefolgt von Gruppe 3 und dann Gruppe 4, aufwies. Im Zeitstrahl stellten wir bei allen Behandlungsgruppen ab der zweiten Stunde im Gegensatz zur Kontrollgruppe keine gravierende Zunahme der Scorewerte zum Perfusionsende hin. Die Werte blieben auf erreichtem Niveau mit geringen Abweichungen. Die Gewichtsdifferenz am Ende der Reperfusion wurde dem Ausgangsgewicht relativ gegenübergestellt. Hier konnte die stärkste Diskrepanz zwischen Ausgangs- und Endgewicht wiederum in der Kontrollgruppe verzeichnet werden. Die Gruppe 2 konnte ähnlich wie im Makroskopie-Score die niedrigste Gewichtsdifferenz, also das beste Resultat erzielen. Signifikanzen traten weder im Vergleich der Gewichts- noch der Makroskopie-Scorewerte auf.

Die I/R-Schädigung der Leber führt durch das interstielle Ödem und die verstärkte Leukozyteninfiltration aus dem Perfusat je nach deren Grad zur Beeinträchtigung der Leberfunktion (Jerome et al. 1994). Dabei befördern die Migration der aktivierten Kupffer-Zellen entlang der Sinusoide, die reduzierte Leukozytengeschwindigkeit durch vermehrte Akkumulation und Adhäsion sowie die Endothelzellschwellung die Stase in der hepatischen Mikrozirkulation (Vollmar et al., 1996), was die Extravasation von Blutplasma, und somit das extrazelluläre Ödem zusätzlich verstärkt. Der protektive Einfluss von Prostazyklin auf die ischämisch geschädigte Leber durch sein antiinflammatorisches Potenzial (Inhibition der Neutrophileninfiltration) wirkt der Ödementstehung und –ausweitung in der Phase der Reperfusion entgegen. Durch Verbesserung der rheologischen Eigenschaften, der Hemmung der

Thrombozytenfunktion sowie der Förderung des Blutflusses kann der Inflammation entgegengewirkt und die Reparatur des geschädigten Gewebes forciert werden.

Die Gesamtheit dieser Prozesse wird reflektiert in der morphologischen Beschaffenheit und im Gewicht der Lebern, wo sich zweifelsohne die spendervorbehandelte Gruppe den anderen Gruppen überlegen zeigt. Trotz der vorrangig besten Funktion rangiert die Gruppe 4 nur unmittelbar vor der Kontrollgruppe im Ranking der makroskopischen Evaluierung. Die visuelle Evaluierung und der prozentuale Gewichtsunterschied der Lebern korrelieren somit in unserer Arbeit nicht mit dem Grad der besten Funktion. Hypothetisch kann hier die sozusagen präventive Iloprostgabe in der Gruppe 2 und 3 zur potentiellen Verhinderung der I/R-Schädigung gegenüber den anderen Versuchsgruppen angeführt werden. Davon könnte allerdings die Gruppe 3, die in der Gewichtszunahme weit vorne rangiert, nur ungenügend profitieren. Die Gewichts Differenz beträgt gegenüber der Gruppe 2 mit 10 % fast 30 %.

Trotz der besten Gesamtflussrate fällt der prozentuale Anteil der Versorgung mit sauerstoffreichem arteriellem Blut an der Gesamtperfusion in der Gruppe 4 im Gegensatz zu Gruppe 3 und 2 erheblich niedriger aus, was die bessere Wertung dieser beiden Gruppen hinsichtlich der Farbe erklärt. Einschränkend hinsichtlich der Methode der makroskopischen Einschätzung kann die Arbeit von Mehrabi et al. (Mehrabi et al., 2003) zitiert werden, die die Heterogenität der Leberperfusion und die Homogenisierung des Gewebeflusses erst nach weit über acht Stunden Reperfusion unterstreicht, und die Einschätzung von Farbe und Perfusionsqualität damit relativiert.

5.8 Mediatoren

5.8.1 TNF- α

Aktivierte Kupffer-Zellen sind ein bedeutender Vermittler des I/R-Schadens der Leber (Jaeschke, Farhood 1991), indem sie proinflammatorische Zytokine, vor allem TNF- α , Chemokine, Sauerstoffradikale und hydrolytische Enzyme freisetzen. TNF- α als ein wichtiges multifaktorielles Zytokin wirkt über die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2, deren Aktivierung zellspezifisch die Zelldifferenzierung, die Apoptose und die Freisetzung weiterer Zytokine auslösen kann. Hauptsächlich wirkt TNF- α wie IL-6 und IL-1 β proinflammatorisch, die im Organismus Fieber verursachen und in der Leber die Produktion von Akute-Phase-Proteinen anregen. Neben diesen Abwehrmechanismen vermittelt TNF- α zelluläre Immunantworten durch Verstärkung zytolytischer Aktivitäten. Die mikrozirkulatorischen Störungen bei hepatischer I/R-Schädigung sind in großem

Maße durch den Endothelzellschaden und die Neutrophilenakkumulation, die TNF- α hervorruft, verursacht. So ist in der Zellkultur gezeigt worden, dass hohe TNF- α -Level zu Fusion von Thrombozyten mit dem Endothel führen können (Lou et al., 1997), die Thrombozyten wiederum können den apoptotischen Zelltod von sinusoidalen Endothelien verursachen (Sindram et al., 2000), weniger über ihre prokoagulatorischen Eigenschaften, als vielmehr über Zell-Zell-Interaktionen und Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine. Bei erhöhtem TNF- α -Level ist die Ratio von endogenem PGI₂ zu TxA₂ vermindert (Combis, Vinel 1991), was eine verstärkte Leukozytenadhärenz und Thrombozytenaggregation triggert. Sowohl in der Inhibition der u. a. durch TNF- α -getriggerten Expression von Adhäsionsmolekülen (Della Bella et al., 2001), die die Interaktion von Endothelien mit Thrombozyten und Leukozyten ermöglichen, als auch in der Hemmung der weiteren Zytokinausschüttung bspw. aus aktivierten Thrombozyten, liegen die potentiellen Angriffspunkte von Prostazyklin in der Prävention der I/R-Schädigung der Leber.

Hinsichtlich der Störung der Mikrozirkulation vermittelt TNF- α die Apoptose endothelialer Zellen über verschiedene Wege (Peralta et al., 2001). Die Inhibition von TNF- α führt insgesamt zu herabgesetzter ischämischer Schädigung, verbessertem Blutfluss und Mikrozirkulation und erhöhter Leberregeneration (Tian et al., 2006). Wiederum konnte die Prostaglandingabe im I/R-Tiermodell an Rattenlebern während und nach der Ischämiezeit die TNF- α -Spiegel signifikant senken (Miyagi et al., 2008). Die Hemmung der Freisetzung und der Expression von TNF- α aus aktivierten Makrophagen konnte durch Prostazyklinanaloga in dosis- und zeitabhängiger Weise nachgewiesen werden (Grundmann et al., 1992).

Die Analyse der TNF- α -Konzentration in den einzelnen Untersuchungsgruppen in unserer Studie zeigt eine zeitliche Dynamik mit fortschreitender Perfusionsdauer. Unmittelbar nach der Ischämie waren die Konzentrationen in allen Gruppen niedrig. Dies spiegelt sich auch in Arbeiten anderer Gruppen wider (Grundmann et al., 1992), da die Kupffer-Zellen als die wesentlichen Zellen der TNF- α -Generierung, erst mit der Phase der Reperfusion aktiviert werden (Caldwell-Kenkel et al., 1991). Zum zweiten Messpunkt nach vier Stunden waren die Level der Behandlungsgruppen abgesehen von kleinen Abweichungen auf nahezu gleichem Niveau deutlich eleviert. Die Kontrollgruppe dagegen zeigte im Vergleich die niedrigsten Spiegel. Zum Ende der Reperfusion sahen wir die Werte zur vierten Reperfusionstunde fast unverändert mit geringen Abweichungen bestehen, auch hier wies die Kontrollgruppe die niedrigsten

Spiegel aus. Signifikanzen traten nicht auf. In Anbetracht der sehr kurzen Halbwertszeit von TNF- α sprechen die konstant hohen Spiegel von TNF- α für eine fortlaufende Exprimierung und Ausschüttung des Zytokins. Aus den Ergebnissen unserer Studie kann kein suppressiver Effekt der Gabe von Iloprost auf die TNF- α -Freisetzung, völlig unabhängig zu welchem Applikationszeitpunkt, abgeleitet werden. So stehen die Resultate der vorliegenden Studie im Gegensatz zu der in Teilen der Literatur belegten hemmenden Wirkung von Prostazyklin auf TNF- α .

TNF- α selbst stimuliert die Ausschüttung von PGI₂ (van der Poll et al., 1991), so dass zum dritten Messzeitpunkt dieser Mechanismus der inhibierenden Autoregulation zu niedrigeren Konzentrationen an TNF- α führen müsste. Auch hier sehen wir in den Ergebnissen unserer Studie keine Entsprechung. Es kann diskutiert werden, ob während der Intervalle, wo keine Konzentrationsmessungen stattfanden, also bspw. zwischen der vierten und der achten Stunde, die Konzentrationen in den einzelnen Gruppen womöglich noch höher waren, so dass eine verzerrte Dynamik der dargestellten Ergebnisse mit nur drei Messzeitpunkten und die Unmöglichkeit einer potentiellen Gruppenunterscheidung resultieren. Andere Autoren konnten jedoch auch keinen oder nur einen geringfügigen Nachweis des positiven Einflusses durch Prostazyklin auf die TNF- α -Konzentration erbringen (Neumann et al., 1999).

5.8.2 Myeloperoxidase - MPO

Die Myeloperoxidase, abgekürzt MPO, ist eine Hauptkomponente der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Gewebsmakrophagen. Nach Aktivierung der Abwehrzellen wird MPO in phagolysosomale Kompartimente und in den Extrazellulärraum sezerniert (Winwood, Arthur, 1993).

In der Schädigung der Leber durch Ischämie/Reperfusion erfüllen die gewebeständigen unspezifischen Abwehrzellen der Leber, die Kupffer-Zellen, die als eine der Hauptquellen MPO generieren, sowohl schädigende als auch reparative Funktionen. So induzieren die reaktiven Sauerstoffzwischenprodukte als Produkt der Kupffer-Zellen oder anderer adhärenter Granulozyten die DNA-Fragmentation und gelten als potente Mediatoren der endothelialen Apoptose (Aoshima et al., 1997). Andererseits dienen sie in ihrer phagozytischen Funktion der Beseitigung von Zelldetritus, Abräumung von apoptotischen Zellen (Gao et al., 1998).

MPO-Spiegel sind nach I/R-Schädigung der Leber erhöht und können durch Iloprost inhibiert werden, wenn die Gabe vor der Ischämiezeit und/oder kontinuierlich während der Reperfusion erfolgt (Harada et al., 2002).

Die Messung von MPO erfolgte zu zwei Messzeitpunkten, unmittelbar postoperativ sahen wir in allen vier Untersuchungsgruppen im Vergleich zur Messung am Ende der Reperfusion niedrigere Konzentrationen pro mg Protein. Zum ersten Messpunkt war die Konzentration in der Gruppe 4, gefolgt von der Gruppe 2 am höchsten. Nach der achtstündigen Reperfusion überstieg die MPO-Konzentration der Kontrollgruppe die der Behandlungsgruppen, die sich annähernd auf demselben Niveau befanden, deutlich, allerdings ohne dass Signifikanzen zu verzeichnen waren. Es könnte somit die potentielle protektive Wirkung von Iloprost im Allgemeinen auf die Inhibition der Granulozytenaktivierung (Totsuka et al., 1998) bestätigt werden, ohne dass ein Vorteil für eines der Behandlungskonzeptes abzuleiten wäre.

5.8.3 RsNO

Die Rolle von NO in der veränderten Gefäßhomöostase bspw. in Inflammationsprozessen, bei I/R-Schädigungen ist janusköpfig. So führt die Inhibition der Stickstoffmonoxidsynthese zu einer Beeinträchtigung der hepatischen Mikrozirkulation (Koeppel et al., 1997). Die Vorbehandlung mit NO-Donatoren konnte den hepatischen Schaden nach warmer Ischämie/Reperfusion in der Rattenleber, gezeigt am Blutfluss und der Alanin-Aminotransferase-Konzentration, reduzieren (Nilsson et al., 2001). Die Arbeit anderer Arbeitsgruppen unterstreicht die protektive Wirkung von NO gegenüber dem von Sauerstoffradikalen herbeigeführten Zellschaden und die damit verbundene Zytotoxizität (Wink et al., 1993). Dabei muss nach Einschätzung anderer Autoren differenziert werden zwischen verschiedenen Modi in der NO-Synthese (Morisue et al., 2003). So führt die selektive Hemmung der induzierbaren NOS, die nur auf inflammatorische Stimuli induziert und mit Verzögerung von einigen Stunden exprimiert wird (Semenza 2005), zur Abnahme des I/R-Schadens durch Verhinderung der Bildung des zytotoxischen Stickstoffmonoxidradikals Peroxynitrit im „oxidativen burst“ durch Abwehrzellen. Niedrige Level der NO-Konzentration gewährleisten jedoch die Aufrechterhaltung einer suffizienten Mikrozirkulation. In Endothelzellen wird die endotheliale NOS (eNOS) konstitutiv exprimiert und garantiert eine kontinuierliche basale NO-Sekretion, die sehr niedrig ist und zu nanomolaren NO-Konzentrationen, die sich kaum nachweisen lassen, führt. NO diffundiert aus den

Endothelzellen in das Gefäßlumen, wo es die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion inhibiert und der Thrombozytenaktivierung und –aggregation entgegenwirkt (Moncada, Higgs, 2006). Höhere Konzentrationen von NO können die Apoptose in Zellen aktivieren (Lane, Gross, 1999).

Die physiologischen Interaktionen zwischen PGI₂ und NO sind vielschichtig. NO und PGI₂ können von Endothelien auf externe Stimuli zusammen freigesetzt und hemmen synergistisch die Thrombozytenaktivierung und vermitteln die Vasodilatation (Mitchell et al., 2008). Neben dem Zusammenwirken von PGI₂ und NO in der Gefäßrelaxation kann jeder Mediator über seine Interaktionen in den Synthese- und Aktivierungswege des jeweils anderen diesen beeinflussen. So spielt NO je nach Erscheinungsform und Konzentration eine divergente Rolle in der Aktivierung und Hemmung der PGI₂- und generell der Prostaglandinsynthese (Deeb et al., 2006). Das reaktive Sauerstoffradikal Peroxynitrit, ein Produkt aus NO und Superoxid, kann in Inflamationsprozessen vasokonstriktive, prokoagulatorische und proadhäsive Gefäßbedingungen im Endothel durch Inaktivierung der PGI₂-Synthese (van der Loo et al., 2000) und Verschiebung der PGI₂- zur PGH-Bildung befördern, dabei hängt die Beeinflussung der Prostaglandinsynthese ganz entscheidend von der Peroxynitritkonzentration ab (Schildknecht, Ullrich, 2009). Nach der Arbeit von Schildknecht et al. führen niedrige Spiegel zur Steigerung der COX-Aktivitäten und der PGI-Synthese, wobei hohe Level gegenläufige Effekte verursachen (Schildknecht, Ullrich 2009).

In der vorliegenden Arbeit lagen die Level der NO-Konzentrationen unmittelbar postischämisch in allen Gruppen auf nahezu gleich niedrigem Niveau, nach der Reperfusion von acht Stunden sahen wir einen Anstieg der gemessenen RsNO-Konzentration in den Gruppen, dabei wiesen alle Behandlungsgruppen niedrigere Konzentrationen als die Kontrollgruppe auf. Die spendervorbehandelte Gruppe zeigt die niedrigste NO-Konzentration, die Reperfusatgruppe die höchste. Hier könnte man die vasodilatative Iloprostwirkung, die teils über NO vermittelt werden könnte, als Erklärungsversuch ins Feld führen. Als Erklärung für die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen können die Hypothesen aus den Kapiteln der Galleausscheidung, des Sauerstoffverbrauchs und der Makrohämodynamik (siehe oben) dienen. In Bezug zur verbesserten Mikrozirkulation, anhand des tiefen Gewebeflusses im Vorhinein gezeigt, findet sich im Gruppenvergleich bei RsNO zur achten Stunde die gleiche Rangfolge der angewendeten Prostaglandinbehandlungsregime.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Marginale Spenderlebern, die aufgrund des relativen Organmangels einen immer breiteren Einsatz in der Transplantationschirurgie erfahren, sind besonders anfällig gegenüber der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion. Prospektiv randomisierte Studien zu vasodilatativen, zytoprotektiven Prostazyklinanaloga, die deren Wirkung zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die I/R-bedingte Schädigung der Leber vergleichen, fehlen bislang. Die vorliegende Studie hat im experimentellen Setting der isolierten extrakorporalen Maschinenperfusion an Schweinelebern versucht, den Einfluss von Iloprost als synthetisches Prostazyklinanalogon auf ausgewählte Schädigungs- und Funktionsparameter zu verschiedenen Applikationszeitpunkten zu belegen, um daraus ein optimales Behandlungskonzept abzuleiten.

In der vorliegenden Arbeit dienten Schweine der deutschen Landrasse als Organspender. Die explantierten Schweinelebern wurden einer Kaltischämie in HTK über einen Zeitraum von 20 Stunden ausgesetzt. Die anschließende normotherme, extrakorporale Leberperfusion wurde über acht Stunden durchgeführt. Insgesamt wurden neben der Kontrollgruppe drei Untersuchungsgruppen betrachtet. Die Spendervorbehandlung mit Iloprost (Ilomedin[®], Schering) erfolgte als intraaortale Injektion in einer Dosierung von 1 µg/kg Iloprost (Ilomedin[®], Schering) unmittelbar vor Einleitung der HTK-Infusion während der Explantation. Die Modifizierung der Konservierung erfolgte als Zusatz von Iloprost zur Konservierungslösung in einer Dosierung von 0.0125 µg/ml. Die kontinuierliche Iloprost-Gabe während der gesamten Reperfusion mit 0,0021µg/kg/min kennzeichnete die Reperfusatgruppe. Gemessen an Gallefluss, Sauerstoffverbrauch und Gesamtblutfluss zeigten sich die Behandlungsgruppen während der Reperfusionsphase der Kontrollgruppe deutlich überlegen. Der günstige Iloprost-Effekt, der durch verbesserte Oxygenierung zu mehr Sauerstoffverbrauch und besserer Funktionsleistung in Form einer gesteigerten Galleproduktion führte, war in der Gruppe 4 am deutlichsten und nachhaltigsten während der gesamten achtstündigen Reperfusion nachweisbar. Auch die Gruppe der modifizierten Konservierungslösung konnte eine gesteigerte Galleproduktion auf dem Boden der verbesserten arteriellen Blutversorgung durchgängig nachgewiesen werden. Für die weiteren Funktionsparameter Harnstoff und Glucose konnte die Überlegenheit einer Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe über die Zeit nicht oder nur bedingt zu einzelnen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die makroskopische Beurteilung über den Reperfusionszeitraum und die Gewichtsdiﬀerenz konnten die

spendervorbehandelte Gruppe als beste klassifizieren, wobei alle Iloprost-Behandlungsgruppen der Kontrolle deutlich überlegen waren. In der Analyse von verschiedenen Mediatoren wie MPO und RsNO konnten wir einen Trend zugunsten der Behandlungsgruppen nachweisen, eine signifikante Überlegenheit eines Therapieregimes ließ sich jedoch nicht belegen.

Als Fazit dieser Arbeit gewährleistet eine Behandlung mit Iloprost im Hinblick auf analysierten Funktions- und Schädigungsparameter eine verbesserte Funktion und reduzierte Schädigung marginaler Spenderlebern, wobei das Konzept der Reperfusion in erster Linie überlegen erscheint. Hinsichtlich der Praktikabilität, der potentiellen Begleiteffekte und der Bedingungen in einem klinischen Rahmen scheint jedoch die HTK-Behandlung im Vergleich zur Therapie in der Reperfusion und im Vergleich zu den Ergebnissen der Spendervorbehandlung von Vorteil zu sein.

Untersuchungen in einem Transplantationsmodell zur Evaluation einer verbesserten Funktion und einer reduzierten Schädigung der Leber könnten basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Studie diese Hypothesen erweitern und bestätigen.

7 LITERATUR

Abouna GM, Fischer LM, Porter KA, Andres G (1973) Experience in the treatment of hepatic failure by intermittent liver hemoperfusions. *Surg Gynecol Obstet* 137 (5): 741-752

Abt PL, Desai NM, Crawford MD et al. (2004) Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Ann Surg* 239 (1): 87–92

Adam R, Cailliez V, Majno P et al. (2000) Normalised intrinsic mortality risk in liver transplantation: European Liver Transplant Registry study. *Lancet* 356 (9230): 621–627

Adham M, Peyrol S, Chevallier M et al. (1997) The isolated perfused porcine liver: assessment of viability during and after six hours of perfusion. *Transplant Int* 10: 299-311

Alfranca A, Iñiguez MA, Fresno M, Redondo JM (2006) Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 70 (3): 446–456

Aguilar HI, Steers JL, Wiesner RH, Krom RA, Gores GJ (1997) Enhanced liver calpain protease activity is a risk factor for dysfunction of human liver allografts. *Transplantation* 63 (4): 612-614

Aoshima H, Satoh T, Sakai N et al. (1997) Generation of free radicals during lipid hydroperoxide-triggered apoptosis in PC12h cells. *Biochim Biophys Acta* 1345 (1): 35-42

Armstead WM (1995) Role of nitric oxide and cAMP in prostaglandin-induced pial arterial vasodilation. *Am J Physiol* 268 (4 Pt 2): H1436–1440

Amin MG, Wolf MP, TenBrook JA Jr et al. (2004) Expanded criteria donor grafts for deceased donor liver transplantation under the MELD system: a decision analysis. *Liver Transpl* 10 (12): 1468–1475

Angele MK, Rentsch M, Hartl WH et al. (2008) Effect of graft steatosis on liver function and organ survival after liver transplantation. *Am J Surg* 195 (2): 214-220

Anthuber M, Farkas S, Rihl M et al. (1996) Conditioning of liver grafts by donor bolus pretreatment with epoprostenol. *Transplantation* 62 (1): 13-17

Baker SJ, Reddy EP (1998) Modulation of life and death by the tumor necrosis receptor superfamily. *Oncogene* 17 (25): 3261-70

Barshes NR, Horwitz IB, Franzini L, Vierling JM, Goss JA (2007) Waitlist mortality decreases with increased use of extended criteria donor liver grafts at adult liver transplant centers. *Am J Transplant* 7 (5): 1265–1270

Belzer FO, May R, Berry MN, Lee JC (1970) Short term preservation of porcine livers. *J Surg Res* 10 (2): 55–61

Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S, Fitzpatrick FA (1985) Synthesis and structure of platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature* 315(6019): 511-513

Bihari D, Smithies M, Gimson A, Tinker J (1987) The effects of vasodilation with prostacyclin on oxygen delivery and uptake in critically ill patients. *N Engl J Med* 317 (7): 397–403

Blumhardt G, Lemmens P, Topalidis T, et al. (1993) Increased flow rate of preservation solution in the hepatic artery during organ preservation can improve postischemic liver function. *Transplant Proc* 25 (4): 2540-2542

Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC (1987) Bile flow: an index of ischemic injury. *J Surg Res* 42 (5): 565-569

Brettschneider L, Daloz PM, Huguet C et al. (1968) The use of combined preservation techniques for extended storage of orthotopic liver homografts. *Surg Gyn Obst* 126: 263-274

Briceño J, Marchal T, Padillo J, Solórzano G, Pera C (2002) Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 74 (4): 522-526

Briegel J, Haller M, Zülke C et al. (1992) Primary graft function following orthotopic liver transplantation: treatment with prostacyclin. *Transplant Proc* 24 (6): 2693-2695

Broekemeier KM, Carpenter DL, Reed DJ, Pfeiffer DR (1992) Cyclosporine A protects hepatocytes subjected to high Ca²⁺ and oxidative stress. *FEBS Lett* 304: 192-194

Bundesärztekammer (2004) Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG, 101. Änderung: Deutsches Ärzteblatt. A246–A247. (<http://www.bundesaerztekammer.de/30/Richtlinien/Richtidx/Organ/organtransplantation.pdf>)

Busquets J, Xiol X, Figueras J et al. (2001) The impact of donor age on liver transplantation: influence of donor age on early liver function and on subsequent patient and graft survival. *Transplantation* 71 (12): 1765-1771

Bustos M, Coffman TM, Saadi S, Platt JL (1997) Modulation of eicosanoid metabolism in endothelial cells in a xenograft model. Role of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 100 (5): 1150-1158

Busuttil RW, Klintmalm G, eds. (2005) Graft failure: etiology, recognition and treatment. In: *Transplantation of the Liver*. 2nd ed. Philadelphia, PA Elsevier Saunders: 915–928

Butler AJ, Rees MA, Wight DG et al. (2002) Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation* 73 (8): 1212–1218

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ (1991) Kupffer cell activation and endothelial damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 13 (1): 83-95

- Camacho M, López-Belmonte J, Vila L (1998) Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res* 83 (4): 353-365
- Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H et al. (2006) Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg* 243 (6): 748-753
- Campra JL, Reynolds TB (1988) The hepatic circulation. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H et al., eds. *The liver: biology and pathophysiology*, New York: Raven: 911
- Cappelli R, Bicchi M, Arrigucci S, Boschi S, Guerrini M, Forconi S. (1999) Critical ischemia in elderly patients. Evaluation of the effect of two different methods of Iloprost therapy on the efficacy, tolerance, modification of quality of life and self-sufficiency. *Minerva Cardioangiol* 47 (3): 81-88
- Caraceni P, Nardo B, Domenicali M et al. (1999) Ischemia-reperfusion injury in fatty rat liver: role of nutritional status. *Hepatology* 29 (4): 1139-1146
- Cargnoni A, Boraso A, Comini L et al. (1991) Role of timing of administration in the cardioprotective effect of iloprost, a stable prostacyclin mimetic. *Eur J Pharmacol* 199 (2): 165-178
- Carrasco L, Sanchez-Bueno F, Sola J et al. (1996) Effects of cold ischemia time on graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. *Transplantation* 61 (3): 393-396
- Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ (2001) Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 167 (5): 2831-2838
- Cescon M, Grazi GL, Cucchetti A et al. (2008) Improving the outcome of liver transplantation with very old donors with updated selection and management criteria. *Liver Transpl* 14 (5): 672-679
- Chen HH, Chen TW, Lin H (2009) Prostacyclin-induced peroxisome proliferator-activated receptor- α translocation attenuates NF- κ B and TNF- α activation after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297 (4): F1109-F1118
- Chlopicki S, Gryglewski RJ (2004) Endothelial secretory function and atherothrombosis. In: *The Eicosanoids*. Ed. Peter Curtis-Prior, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England: 267-276
- Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM (1992) Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53 (5): 957-978

- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46 (2): 205-229
- Combis JM, Vinel JP (1991) Vasodilator agents in portal hypertension. *Gastroenterol Clin Biol* 15 (12): 881-887
- Craig AB (1966) Glucose, lactate and potassium metabolism in the isolated perfused rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 121: 281-286
- Crutchley DJ, Conanan LB, Que BG (1994) Effects of prostacyclin analogs on the synthesis of tissue factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in human monocytic THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 271 (1): 446-451
- Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G (2002) Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemia preconditioning. *Free Radic Biol Med* 33 (9): 1200-1208
- Cywes R, Greig PD, Morgan GR et al. (1992) Rapid donor liver nutritional enhancement in a large animal model. *Hepatology* 16 (5): 1271-1279
- D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW et al. (1991) The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 51 (1): 157-163
- D'Alessandro AM, Stratta RJ, Southard JH, Kalayoglu M, Belzer FO (1989) Agonal hepatic arterial vasospasm. *Surg Gynecol Obstet* 169 (4): 324-328
- Darville MI, Eizirik DL (1998) Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* 41 (9): 1101-1108
- Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ (1993) Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 264 (4 Pt 1): C961-C967
- De Backer D, Berré J, Zhang H, Kahn RJ, Vincent JL (1993) Relationship between oxygen uptake and oxygen delivery in septic patients: effects of prostacyclin versus dobutamine. *Crit Care Med* 21 (11): 1658-1664
- De Carlis L, Colella G, Sansalone CV et al. (1999) Marginal donors in liver transplantation: the role of donor age. *Transplant Proc* 31 (1-2): 397-400
- Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192 (2): 245-261
- Deeb RS, Shen H, Gamss C et al. (2006) Inducible nitric oxide synthase mediates prostaglandin H2 synthase nitration and suppresses eicosanoid production. *Am J Pathol* 168 (1): 349-362

Della Bella S, Molteni M, Mocellin C et al. (2001) Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 65 (2-3): 73-83

Dickson RC, Bronk SF, Gores GJ (1992) Glycine cytoprotection during lethal hepatocellular injury from adenosine triphosphate depletion. *Gastroenterology* 102 (6): 2098-2107

Dutkowski P, de Rougemont O, Clavien PA (2008) Machine perfusion for 'marginal' liver grafts. *Am J Transplant* 8 (5): 917–924

Dutkowski P, Graf R, Clavien PA (2006) Rescue of the cold preserved rat liver by hypothermic oxygenated machine perfusion. *Am J Transplant* 6 (5 Pt 1): 903–912

Ehringer WD, Su S, Chiang B, Stillwell W, Chien S (2002) Destabilizing effects of fructose-1,6-bisphosphate on membrane bilayers. *Lipids* 37 (9): 885–892

Eisele RM, Meissner W, Nüssler NC, Platz KP, Settmacher U, Neuhaus P (2001) Hepatic artery resistance as a marker for preservation/reperfusion injury. *Transplant Proc*, 33 (1-2): 959-961

Eiseman B, Liem S, Raffucci F (1965) Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure. *Ann Surg* 162: 329-345

Eurotransplant International Foundation: Annual Report 2008, at http://www.eurotransplant.org/files/annual_report/ar_2008.pdf

Farkas S, Bolder U, Schlittenbauer T et al. (2005) Conditioning of liver grafts with prostaglandins improves bile acid transport. *Transplant Proc* 37 (1): 435–438

Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL et al. (2006) Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant* 6 (4): 783–790

Feng XN, Xu X, Zheng SS (2006) Current status and perspective of liver preservation solutions. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5 (4): 490-494

Ferrari R, Cargoni A, Curello S, Boffa SM, Ceconi C (1989) Effects of iloprost (ZK 36374) on glutathione status during ischemia and reperfusion of rabbit isolates hearts. *Br J Pharmacol* 98 (2): 678-684

Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J (2007) Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82 (1-4):109-118

von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW (2003) Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 16 (11): 806-813

Fraser R, Bowler LM, Day WA, Dobbs B, Johnson HD, Lee D (1980) High perfusion pressure damages the sieving ability of sinusoidal endothelium in rat livers. *Br J Exp Pathol* 61 (2): 222-228

Freeman RB Jr, Steffick DE, Guidinger MK, Farmer DG, Berg CL, Merion RM (2008) Liver and intestine transplantation in the United States, 1997–2006. *Am J Transplant* 8 (4 Pt 2): 958–976

Funke K, Schrör K (1985) Preservation of ischemia-induced loss of myocardial catecholamines and sympathetic nerve stimulation by synthetic prostacyclin analogue iloprost (ZK 36 374): In Schrör (Ed.) Prostaglandins and other eicosanoids in the cardiovascular system. Proceedings of the 2nd International Symposium, Nürnberg-Fürth: 310-315, Karger, Basel

Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA (1998) Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 27 (6): 1652-1660

García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R et al. (1998) Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int* 11 (6): 424-432

Gelman S, Ernst EA (1977) Role of pH, pCO₂ and O₂ content of portal blood in hepatic circulatory autoregulation. *Am J Physiol* 233 (4): E255–262

Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M (2005) Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 146 (6): 834–845

Gonzalez FX, Rimola A, Grande A et al. (1994) Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation. *Hepatology* 20 (3): 565-573

Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF (1986) The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 6 (3): 511–517

Goto S, Kim YI, Kawano K, Kai T, Kobayashi M (1992) Efficacy of PGI₂ analog in preventing ischemia reperfusion damage of liver grafts from living donors. *Transpl Int*. 5 Suppl 1: S366-369

Goto S, Kim YI, Kodama Y et al. (1993) The effect of a prostaglandin I₂ analogue (OP-41483) on energy metabolism in liver preservation and its relation to lipid peroxidative reperfusion in rats. *Cryobiology* 30 (5): 459-465

Grundmann HJ, Hähnle U, Hegenscheid B, Sahlmüller G, Bienzle U, Blitstein-Willinger E (1992) Inhibition of endotoxin-induced macrophage tumor necrosis factor expression by a prostacyclin analogue and its beneficial effect in experimental lipopolysaccharide intoxication. *J Infect Dis* 165 (3): 501-505

Guarrera JV, Estevez J, Boykin J et al. (2005) Hypothermic machine perfusion of liver grafts for transplantation: technical development in human discard and miniature swine models. *Transplant Proc* 37 (1): 323–325

Gurgul-Convey E, Lenzen S (2010) Protection against cytokine toxicity through endoplasmic reticulum and mitochondrial stress prevention by prostacyclin synthase

overexpression in insulin-producing cells. *J Biol Chem* 285 (15): 11121–11128

Gurusamy KS, Kumar Y, Ramamoorthy R, Sharma D, Davidson BR (2009) Vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev.* (1): CD007530

Hałoń A, Patrzalek D, Rabczyński J (2006) Hepatic steatosis in liver transplant donors: rare phenomenon or common feature of donor population? *Transplant Proc* 38 (1): 193-195

Harada N, Okajima K, Murakami K, Isobe H, Liu W (1999) Gastric Prostacyclin (PGI₂) prevents stress-induced gastric mucosal injury in rats primarily by inhibiting leukocyte activation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 57 (5-6): 291-303

Harada N, Okajima K, Uchiba M (2006) Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Crit Care Med* 34 (7): 1883-1891

Harada N, Okajima K, Uchiba M, Katsuragi T (2002) Ischemia/reperfusion-induced increase in the hepatic level of prostacyclin is mainly mediated by activation of capsaicin-sensitive sensory neurons in rats. *J Lab Clin Med* 139 (4):218-226

't Hart NA, der van Plaats A, Leuvenink HG et al. (2007) Determination of an adequate perfusion pressure for continuous dual vessel hypothermic machine perfusion of the rat liver. *Transpl Int* 20 (4): 343–352

Hassan S, Pickles H (1983) Epoprostenol (prostacyclin, PGI₂) increases apparent liver blood flow in man. *Prostaglandins Leukot Med* 10 (4): 449–454

Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonish M, Tanabe T(2001) Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem* 276 (49): 46260–46267

Hayes JS, Lawler OA, Walsh MT, Kinsella BT (1999) The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 274 (34): 23707-23718

Helling TS, Wogahn BM, Olson SA, Evans LS, Reddy BR, VanWay C 3rd (1995) The effect of prostaglandin E1 on liver adenine nucleotides and cytoplasmic enzymes in a porcine model of normothermic hepatic ischemia *Hepatology* 22 (5): 1554-1559

Hellinger A, Fiegen R, Lange R, Rauen U, Schmidt U, Hirche H, Kaiser S, de Groot H, Erhard J, Eigler FW (1997) Preservation of pig liver allografts after warm ischemia: normothermic perfusion versus cold storage. *Langenbecks Arch Chir* 382: 175-184

Henderson JM, Gilmore GT, Mackay GJ, Galloway JR, Dodson TF, Kutner MH (1992) Hemodynamics during liver transplantation: the interactions between cardiac output and portal venous and hepatic arterial flows. *Hepatology* 16 (3): 715–718

Hertl M, Hertl MC, Kluth D, Broelsch CE (2000) Hydrophilic bile salts protect bile duct epithelium during cold preservation: A scanning electron microscopy study. *Liver Transpl* 6 (2): 207-212

- Hickman R, Saunders SJ, Terblanche J (1970) Liver function in the pig: The total hepatic and portal flow values in vivo. *S.A. J Lab Clin Med*: 1197-1200
- Hiraoka K, Koike H, Yamamoto S et al. (2003) Enhanced therapeutic angiogenesis by cotransfection of prostacyclin synthase gene or optimization of intramuscular injection of naked plasmid DNA. *Circulation* 108 (21): 2689–2696
- Hiratsuka K, Kim YI, Nakashima K, Kawano K, Yoshida T, Kitano S (2000) Tissue oxygen pressure during prolonged ischemia in the liver. *J Surg Res* 92 (2): 250-254
- Hossain MA, Hamamoto I, Wakabayashi H et al. (1999) Experimental study of the effect of intraportal prostaglandin E1 on hepatic blood flow during reperfusion after ischemia and hepatectomy. *Br J Surg* 86 (6): 776-783
- Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conrad J (1978) Tolerance of human liver prolonged normothermic ischemia: a biological study of 20 patients submitted to extensive hepatectomy. *Arch Surg* 113: 1448-1451
- Imber CJ, St Peter SD, Lopez dC I et al. (2002) Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation* 73 (5): 701–709
- Imamura H, Brault A, Huet PM (1997) Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 25 (3): 664-671
- Jaeschke H, Farhood A (1991) Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260 (3 Pt 1): G355-G362
- Jain S, Xu H, Duncan H et al. (2004) Ex-vivo study of flow dynamics and endothelial cell structure during extended hypothermic machine perfusion preservation of livers. *Cryobiology* 48 (3): 322– 332
- Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Southard JH, Belzer FO (1988) A comparison of cold storage solutions for hepatic preservation using isolated perfused rabbit liver. *Cryobiology* 25 (4): 300-310
- Jerome SN, Akimitsu T, Korhuis RJ (1994) Leukocyte adhesion, edema, and development of postischemic capillary no-reflow. *Am J Physiol* 267 (4 Pt 2): H1329–H1336
- Jörres A, Dinter H, Topley N, Gahl GM, Frei U, Scholz P (1997) Inhibition of tumor necrosis factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: cellular mechanisms. *Cytokine* 9 (2): 119-125
- Kamiike W, Nakahara M, Nakao K et al. (1985) Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation* 39 (1): 50-55
- Karwinski W, Husøy AM, Farstad M, Søreide O (1989) Sixty minutes of normothermic ischemia: correlation between cellular adenine nucleotides and bile excretion. *J Surg Res* 46 (2): 99-103

Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G et al. (1997) Efficacy of intraportal infusion of prostaglandin E1 to improve the hepatic blood flow and graft viability in porcine liver transplantation. *Transplantation* 64 (2): 205-209

Kawada N, Mizoguchi Y, Shin T et al. (1990) Synthesis of eicosanoids by *Propionibacterium acnes*-elicited liver adherent cells and their effect on production of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 41 (3): 187-193

Kitai T, Tanaka A, Tokuka A et al. (1995) Intraoperative measurement of the graft oxygenation state in living related liver transplantation by near infrared spectroscopy. *Transpl Int* 8 (2): 111-118

Klein M, Geoghegan J, Wangemann R, Böckler D, Schmidt K, Scheele J (1999) Preconditioning of donor livers with prostaglandin I2 before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67 (8): 1128-1132

Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, et al. (1995) Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 59 (6): 772–779

Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P et al. (1997) Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia /reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular flow. *J Hepatol* 27 (1): 163-169

Krebs HA (1974) Metabolic requirements of isolated organs. *Transplant Proc* 6 (3): 237-239

Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D (1988) Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* 263 (11): 5380-5384

Lai YJ, Pullamsetti SS, Dony E et al. (2008) Role of the prostanoid EP4 receptor in iloprost-mediated vasodilatation in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 178 (2): 188-196

Lane P, Gross SS (1999) Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 19(3): 215-229

Lautt WW, Legare DJ, Ezzat WR (1990) Quantitation of the hepatic arterial buffer response to graded changes in portal blood flow. *Gastroenterology* 98 (4): 1024–1028

Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG (1995) Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1(2):124-138

Li RC, Cindrova-Davies T, Skepper JN, Sellers LA (2004) Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 94 (6): 759–767

Lie TS (1981) Treatment of acute liver failure by extracorporeal hemoperfusion over human and baboon liver. In: *Artificial liver support*: 268-273. Springer Verlag Berlin

- Liou JY, Matijevic-Aleksic N, Lee S, Wu KK (2007) Prostacyclin inhibits endothelial cell XIAP ubiquitination and degradation. *J Cell Physiol* 212 (3): 840–848
- Loinaz C, González EM (2000) Marginal donors in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 47 (31): 256-263
- Lou J, Donati YR, Juillard P et al. (1997) Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 151 (5): 1397-1405
- Lovgren AK, Jania LA, Hartney JM et al. (2006) COX-2-derived prostacyclin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291 (2): L144–L156
- Maluf DG, Edwards EB, Kauffman HM (2006) Utilization of extended donor criteria liver allograft: Is the elevated risk of failure independent of the model for end-stage liver disease score of the recipient? *Transplantation* 82: 1653–1657
- Manzarbeitia CY, Ortiz JA, Jeon H et al. (2004) Long-term outcome of controlled, non-heart-beating donor liver transplantation. *Transplantation* 78 (2): 211–215
- Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L et al. (1996) Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation* 62 (9): 1246–1251
- Mateo R, Cho Y, Singh G et al. (2006) Risk factors for graft survival after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of OPTN/UNOS data. *Am J Transplant* 6 (4): 791–796
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312 (3): 159-163
- McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB et al. (2009) ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol* 53 (17):1573-1619
- Mehrabi A, Gollig M, Jahnke C et al. (2003) Characterization of hepatic parenchymous perfusion heterogeneity and regional flow kinetics after porcine liver transplantation. *Microvasc Res* 65 (2): 78–87
- Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B (1999) Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 46 Suppl 2: 1452-1457
- Menger MD, Vollmar B (2000) Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 7 (5): 291–306

- Merion RM, Pelletier SJ, Goodrich N, Englesbe MJ, Delmonico FL (2006) Donation after cardiac death as a strategy to increase deceased donor liver availability. *Ann Surg* 244 (4): 555–562
- Mets B, Rose-Innes C, Lotz Z, Hickman R, Chalton D (1993) Comparison of in-vivo and ex-vivo porcine liver function using the same liver. *J Hepatol* 17 (1): 3-9
- Mieth M, Schemmer P, Encke J et al. (2006) Heidelberg Manual der Lebertransplantation. Universitätsklinikum Heidelberg, 2nd Edition, ISBN 3-9808751-1-3.
- Miller, SB (2006) Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum* 36 (1): 37-49
- Minor T, Akbar S, Tolba R, Dombrowski F (2000) Cold preservation of fatty liver grafts: Prevention of functional and ultrastructural impairments by venous oxygen persufflation. *J Hepatol* 32 (1):105-111
- Minor T, Saad S, Nagelschmidt M et al. (1998) Successful transplantation of porcine livers after warm ischemic insult in situ and cold ischemic preservation including postconditioning with gaseous oxygen. *Transplantation* 65 (9): 1262-1264
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS (2008) Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 93 (1): 141–147
- Mitchell JA, Warner TD (2006) COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov* 5 (1): 75–86
- Miyagi S, Okada A, Oikawa K, Sato A, Fujimori K, Satomi S (2008) Effects of serine protease inhibitor and prostaglandin I₂ on liver transplantation from non–heart-beating rat donors. *Transplant Proc* 40 (7): 2152–2155
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263 (5579): 663-665
- Moncada S, Higgs EA (2006) Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* (176 Pt 1): 213–254
- Moncada S, Vane JR (1978) Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endo-peroxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30 (3): 293-331
- Morimoto Y, Kamiike W, Nishida T et al. (1996) Improvement of rat liver graft function by insulin administration to donor. *Gastroenterology* 111 (4):1071-1080
- Morisue A, Wakabayashi G, Shimazu M et al. (2003) The role of nitric oxide after a short period of liver ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 109 (2): 101-109

- Mulvin D, Jones K, Howard R, Grosso M, Repine J, Johnston M (1990) The effect of prostacyclin as a constituent of preservation solution in protecting lungs from ischemic injury because of its vasodilatory properties. *Transplantation* 49 (4): 828-830
- Mutimer DJ, Gunson B, Chen J et al. (2006) Impact of donor age and year of transplantation on graft and patient survival following liver transplantation for hepatitis C virus. *Transplantation* 81(1): 7-14
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79 (4): 1193–1226
- Natori S, Selzner M, Valentino KL et al. (1999) Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 68 (1): 89–96
- Neuhaus P, Blumhardt G (1993) Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. *Int J Artif Organs* 16 (10): 729-739
- Neumann UP, Kaisers U, Langrehr JM et al. (2000) Administration of prostacyclin after liver transplantation: a placebo controlled randomized trial. *Clin Transplant* 14 (1): 70-74
- Neumann UP, Kaisers U, Langrehr JM et al. (1999) Reduction of reperfusion injury with prostacyclin I2 after liver transplantation. *Transplant Proc* 31(1-2): 1029-1030
- Nilsson B, Delbro D, Wallin M, Friman S (2001) Protective effect of nitric oxide and prostaglandin E2 in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 33 (4): 2518–2520
- Nishida T, Koseki M, Kamiikew et al. (1987) Levels of purine compounds in a perfusate as a biochemical marker of ischemic injury of the cold-preserved liver. *Transplantation* 44 (1): 16-21
- Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ (1993) The greater vulnerability of bile duct to reoxygenation injury than to anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. *Transplantation* 56 (3): 495-500
- Norel X (2007) Prostanoid receptors in the human vascular wall. *ScientificWorldJournal* 7: 1359–1374
- Oda M, Yokomori H, Han JY (2003) Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 29 (3-4): 167–182
- Oldhafer KJ, Schüttler W, Hauss J, Spiegel HU, Pichlmayr R (1993) Analysis of hepatic hemodynamics after orthotopic liver transplantation: an experimental study in pigs. *Transplant Proc.* 25 (4): 2599
- Olschewski H, Rose F, Schermuly R et al. (2004) Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 102 (2): 139-153

Olthoff K, Wasef E, Seu P et al. (1991) PGE1 reduces injury in hepatic allografts following preservation. *J of Surg Res* 50 (6): 595-601

Pakrasi PL, Jain AK (2008) Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79 81-2): 27–33

Pannen BH (2002) New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesth Analg* 94 (6): 1448–57

Pascher A, Sauer IM, Hammer C, Gerlach JC, Neuhaus P (2002) Extracorporeal liver perfusion as hepatic assist in acute liver failure: a review of world experience. *Xenotransplantation* 9 (5): 309-324

Peralta C, Fernández L, Panés J et al. (2001) Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 33 (1): 100-113

Perera MT, Mirza DF, Elias E (2009) Liver transplantation: Issues for the next 20 years. *J Gastroenterol Hepatol* 24 Suppl 3: S124–S131

Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ (1999) Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (8): 4668–4673

Pienaar BH, Lindell SL, Van Gulik T, Southard JH, Belzer FO (1990) Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion *Transplantation* 49 (2): 258-260

Piratvisuth T, Tredger JM, Hayllar KA, Williams R (1995) Contribution of true cold and rewarming ischemia times to factors determining outcome after orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1 (5): 296-301

Pirenne J, Monbaliu D, Aerts R et al. (2009) Biliary strictures after liver transplantation: risk factors and prevention by donor treatment with epoprostenol. *Transplant Proc* 41 (8): 3399–3402

Pirenne J, Van Gelder F, Aerts R et al. (2008) Abdominal transplant surgery and transplant coordination, University Hospitals Leuven 1997–2007: an overview. *Acta Chir Belg* 108 (1): 15-21

Pokorny H, Rasoul-Rockenschaub S, Langer F et al. (2004) Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation-a prospective multi-center observation study. *Transpl Int* 17: 256-260

Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzalez AP, Herfarth C, Messmer K (1992) The impact of arterialization on hepatic microcirculatory and leukocyte accumulation after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 54 (5): 789-794

- Post S, Rentsch M, Gonzalez AP, Palma P, Otto G, Menger MD (1995) Importance of the first minutes of reperfusion in hepatic preservation injury. *Transplant Proc* 27 (1): 727-728
- Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD (1993) Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 18 (6): 1490-1497
- Puhl G, Schaser KD, Pust D et al. (2004) The delay of rearterialization after initial portal reperfusion in living donor liver transplantation significantly determines the development of microvascular graft dysfunction. *J Hepatology* 41 (2): 299-306
- Puhl G, Schaser KG, Pust D et al. (2005) Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 11 (5): 555-563
- Rappaport AM (1980) Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol* 21: 1–63
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H (1999) Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by active oxygen species. *FASEB J* 13 (1): 155-168
- Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157 (5):1415–1430
- Reddy SP, Bhattacharjya S, Maniakin N et al. (2004) Preservation of porcine non-heart-beating donor livers by sequential cold storage and warm perfusion. *Transplantation* 77 (9): 1328–1332
- Reddy S, Greenwood J, Maniakin N et al. (2005) Non-heart-beating donor porcine livers: The adverse effect of cooling. *Liver Transplant* 11 (1): 35–38
- Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD et al. (2000) Controlled non-heart-beating donor liver transplantation: a successful single center experience, with topic update. *Transplantation* 70 (8): 1159-1166
- Rentsch M, Beham A, Iesalnieks I, Mirwald T, Anthuber M, Jauch KW (2001) Impact of prolonged cold ischemia and reperfusion on apoptosis, activation of caspase 3, and expression of bax after liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 33 (1-2): 850-851
- Riedel GL, Scholle JL, Shepherd AP, Ward WF (1983) Effects of hematocrit on oxygenation of isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 245 (6): G769-G774
- Rinella ME, Alonso E, Rao S et al. (2001) Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl* 7 (5): 409–414
- Rossi M, De Simone P, Peritore D et al. (2001) Liver transplantation: expanding the donor pool. *Transplant Proc* 33 (1-2): 1307-1309

Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403 (6765): 103–108

Ruffolo AJ, Romano M, Ciapponi A (2010) Prostanoids for critical limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD006544

Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ferguson DM, Krom RA (1991) Improved liver preservation with addition of iloprost to Eurocollins and University of Wisconsin storage solutions. *Transplantation* 52 (6): 1105-1107

Schaubel DE, Sima CS, Goodrich NP, Feng S, Merion RM (2008) The survival benefit of deceased donor liver transplantation as a function of candidate disease severity and donor quality. *Am J Transplant* 8 (2): 419–425

Schemmer P, Bunzendahl H, Raleigh JA, Thurman RG (1999) Graft survival is improved by hepatic denervation before organ harvesting. *Transplantation* 67 (10): 1301–1307

Schemmer P, Nickkholgh A, Hinz U et al. (2007) Extended donor criteria have no negative impact on early outcome after liver transplantation: a single-center multivariate analysis. *Transplant Proc* 39 (2): 529–534

Schildknecht S, Ullrich V (2009) Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem and Biophys* 484 (2): 183–189

Schoen Smith JM, Lauth WW (2005) The role of prostaglandins in triggering the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 13 (2): 111–117

Schön MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG (1993) The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 56: 24-31

Schön MR, Kollmar O, Akkoc N et al. (1998) Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation. *Transplant Proc* 30 (5): 2318-2320

Schön MR, Kollmar O, Wolf S et al. (2001) Liver Transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 233 (1): 114-123

Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M (2001) Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 62 (9): 1153–1161

Semenza GL (2005) New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. *J Clin Invest* 115 (11): 2976–2978

Sen PK, Bhalerao RA, Parulkar GP, Samsi AB, Shah BK, Kinare SG (1966) Use of isolated perfused cadaveric liver in the management of hepatic failure. *Surgery* 59 (5): 774-81

- Sharma S, Gurakar A, Jabbour N (2008) Biliary strictures following liver transplantation: past, present and preventive strategies. *Liver Transpl* 14 (6): 759-769
- Shinmura K, Tang XL, Wang Y et al. (2000) Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (18): 10197-10202
- Shinohara H, Tanaka A, Fujimoto T et al. (1997) Prostaglandin E1 resuscitates hepatic organic anion transport independent of its hemodynamic effect after warm ischemia. *J Surg Res* 68 (1): 56-62
- Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. (2000) Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118 (1): 183-191
- Sirois J, Richards JS (1992) Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* 267 (9): 6382-6388
- Soler HM, Watkins MT, Albadawi H, Kadowaki H, Patton GM (1997) Effects of oxygen tension and shear stress on human endothelial cell prostacyclin production, *J Surg Res* 67 (1): 46-53
- Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA (2000) Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 275 (41): 32037-32045
- St Peter SD, Imber CJ, Lopez I, Hughes D, Friend PJ (2002) Extended preservation of non-heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion. *Br J Surg* 89 (5): 609-616
- Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K (1988) Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation* 46 (4): 506-509
- Syrakos TP, Wight DG, McMaster P, Marni A, Alfani D (1979) Damage to the biliary tract during preservation. *Transplantation* 28: 166
- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Nizankowski R, Musial J, Pieton R, Mruk J (1978) Circulatory and anti-platelet effects of intravenous prostacyclin in healthy men. *Pharmacol Res Commun* 10(6): 545-56
- Tian Y, Jochum W, Georgiev P, Moritz W, Graf R, Clavien PA (2006) Kupffer cell-dependent TNF- α signaling mediates injury in the arterialized small-for-size liver transplantation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (12): 4598-4603
- Tolboom H, Pouw R, Uygun K et al. (2007) A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng* 13 (8): 2143-2151

- Totsuka E, Todo S, Zhu Y et al. (1998) Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol, and prostaglandin I2 analogue, OP-41483. *J Am Coll Surg* 187 (3): 276-286
- Trowell OA (1942) Urea formation in isolates perfused rat liver. *J Physiol* 100: 432-458
- Tsikas D, Gutzki FM, Rossa S et al. (1997) Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay-solutions by gaschromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 244 (2): 208-220
- Vajdová K, Smreková R, Mislánová C, Kukan M, Lutterová M (2000) Cold-preservation-induced sensitivity of rat hepatocyte function to rewarming injury and its prevention by short-term reperfusion. *Hepatology* 32 (2): 289-296
- Van der Loo B, Labrugger R, Skepper JN et al. (2000) Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med.* 192 (12): 1731–1744
- Van der Poll T, van Deventer SJ, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW (1991) Comparison of the early dynamics of systemic prostacyclin release after administration of tumor necrosis factor and endotoxin to healthy humans. *J Infect Dis* 164 (3): 599–601
- Vekemans K, Liu Q, Pirenne J, Monbaliu D (2008) Artificial circulation of the liver: machine perfusion as a preservation method in liver transplantation. *Anat Rec* 291 (6): 735–740
- Vekemans K, Liu Q, Brassil J, Komuta M, Pirenne J, Monbaliu D (2007) Influence of flow and addition of oxygen during porcine liver hypothermic machine perfusion. *Transplant Proc* 39 (8): 2647– 2651
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD (1994) Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145(6):1421-31
- Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K (1994) Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 267 (5 Pt 1): G786-793
- Vollmar B, Richter S, Menger MD et al. (1996) Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 270: G798-G803
- Wheeler-Jones CP, Farrar C, Garonna E (2009) Protease-activated receptors, cyclooxygenases and pro-angiogenic signalling in endothelial cells. *Biochem Soc Trans* 37 (Pt6): 1179-1183
- Winch P (1971) Pig liver perfusion and other methods of temporary liver support. *Br Med J* 1 216

Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (21): 9813-9817

Winkler K, Keiding S, Tonnesen K, Tygstrups N (1985) Effect of short lasting hypoxia on the metabolic function of the perfused pig liver. Comparison of ischemic and hypoxemic hypoxia. *Eur J Clin Invest* 16: 106-112

Winwood PJ, Arthur MJ (1993) Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* 13 (1): 50-59

Wojcicki M, Milkiewicz P, Silva M (2008) Biliary tract complications after liver transplantation: a review. *Dig Surg* 25 (4): 245-257

Wolf S, Schön MR, Kräutlein K et al. (1998) Effects of epoprostenol and norepinephrine on hemodynamics of the isolated perfused liver. *Transplant Proc* 30 (5): 2334-2335

Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW, James OF (1989) The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 9 (2): 297-301

Xavier FE, Blanco-Rivero J, Ferrer M, Balfagón G (2009) Endothelin modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP1 and TP receptors. *Br J Pharmacol* 158 (7): 1787-1795

Yamamoto N, Konishi Y, Wakashiro S et al. (1991) Seventy-two-hour preservation of porcine liver by continuous hypothermic perfusion with UW solution in comparison with simple cold storage. *J Surg Res* 51 (4): 288–292

Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Oishi R (2004) A prostacyclin analog beraprost sodium attenuates radiocontrast media-induced LLC-PK1 cells injury. *Kidney Int* 65 (5): 1654–1663

Zhang XP, Hintze TH (2006) cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (6): 2376–2384

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°	Grad
°C	Grad Celsius
Δ m	Gewichtsdifferenz
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M/ μ mol	Mikromol
aqua dest. / a. d.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body Mass Index
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm H ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
dl	Deziliter
DRI	Donor Risk Index
EDC	Extended Donor Criteria, erweiterte Kriterien für Spenderlebern
Et CO ₂	endtidaler Druck von CO ₂
Fa.	Firma
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h, hs	Stunden
Hb	Hämoglobin
HAES	Hydroxyaethylstärke
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
Hz	Hertz

IE	Internationale Einheiten
ikB	Inhibitor des NFκB
Il-6	Interleukin 6
IL-1β	Interleukin 1β
IP-Rezeptor	Prostazyklin-Rezeptor
I/R	Ischämie/Reperfusion
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
K ⁺	Kalium
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIZ	kalte Ischämiezeit
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mU	Milliunit
MELD	Model of Endstage Liver Disease
MPO	Myeloperoxidase
Na ⁺	Natrium
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NHBD	Non-Heart-Beating Donors/nichtherzschlagende Spender
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
Pg	Pikogramm
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , Iloprost
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren
r	rounds, Umdrehungen
RsNO	Nitroso-Thiole
s	Sekunde
TNF	Tumornekrosefaktor

TXA ₂	Thromboxan
TP-Rezeptor	Thromboxan-Rezeptor
U	Unit

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Tanoa Junge, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleich des Einflusses von Iloprost zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten auf ausgewählte Funktions- und Schädigungsparameter der durch Ischämie/Reperfusion-geschädigten Schweineleber, untersucht im isolierten extrakorporalen normothermen Perfusionskreislauf“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Potsdam, 27.10.2010

10 LEBENSLAUF

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

11 DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. G. Puhl für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt außerdem Wenzel Schoening und Ines Feige, ohne die die Realisierung des Themas nie möglich gewesen wäre.

Spiridoula Coskina und Almuth Wallstab danke ich für ihre Hilfe und die nette, entspannte Atmosphäre während des experimentellen Teils dieser Dissertation.

Dem Team der tiermedizinischen Einrichtung der Charité mit allen ihren Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung und Hilfe während der Leberexplantationen und der extrakorporalen Perfusion.

Frau E. Hungerbühler danke ich für die intensive Zusammenarbeit und die kompetente Anleitung und Hilfe während der molekularbiologischen Analysen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich im privaten Bereich unterstützt haben. Besonders meiner Mutter danke ich für ihre stete Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die mich unterstützt und motiviert haben.