

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

DISSERTATION

Prostaglandin I<sub>2</sub> (Iloprost) reduziert den Ischämie/  
Reperfusionsschaden der marginalen Schweineleber  
-Untersuchung im extrakorporalen Leberperfusionskreislauf-

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ines Scholl (geb. Feige)

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.Juni 2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>Abstrakt .....</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1.	Einführung .....	9
1.2.	Die Leber .....	10
1.3.	PGI <sub>2</sub> und die extrakorporale Leberperfusion .....	11
1.4.	Ableitung der Aufgabenstellung, Hypothese und Studienendpunkte .....	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Material.....	12
2.1.1.	Tiere und Tierhaltung.....	12
2.1.2.	Die Konservierungslösung – HTK – Lösung .....	13
2.1.3.	Das Perfusat.....	13
2.1.4.	Iloprost.....	14
2.2.	Methoden.....	15
2.2.1.	Sedation, Narkose und intraoperative Überwachung.....	15
2.2.2.	Die Operation.....	16
2.2.3.	Die Konservierung .....	17
2.2.4.	Das Perfusionsmodell.....	18
2.2.5.	Die Organperfusion.....	20
2.3.	Die Versuchsgruppen .....	21
<b>3.</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>22</b>
3.1.	Makroskopie und Gewichtszunahme .....	22
3.2.	Laborchemische Bestimmungen.....	22
3.3.	Bestimmung von Mediatoren .....	23
3.3.1.	cGMP (cyklisches Guanosinmonophosphat) .....	23
3.3.2.	MPO (Myeloperoxidase) .....	25
3.4.	Mikrodialyse (MD).....	26
3.5.	Datenauswertung/ Statistik .....	28
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1.	Makroskopische Ergebnisse .....	30
4.2.	Gewichtszunahme der Leber .....	31
4.3.	Laborchemische Ergebnisse .....	31

4.3.1.	ASAT (Aspartat-Aminotransferase) .....	32
4.3.2.	ALAT (Alanin- Aminotransferase) .....	33
4.3.3.	GLDH (Glutamatdehydrogenase) .....	34
4.3.4.	LDH (Laktatdehydrogenase).....	34
4.3.5.	Glukose in % zur Präperfusion .....	36
4.3.6.	Laktat in mg/dl .....	36
4.3.7.	Elektrolyte .....	37
4.3.8.	Mediatoren.....	40
4.3.8.1.	cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) .....	40
4.3.8.2.	MPO (Myeloperoxidase ) .....	41
4.4.	Mikrodialyseergebnisse der Kontroll-, Spender- und HTK- Gruppe .....	42
4.4.1.	Glukosekonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen .....	42
4.4.2.	Glycerinkonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen .....	45
4.4.3.	Laktatkonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen .....	48
4.4.4.	Pyruvatkonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen .....	51
4.4.5.	Darstellung der Laktat/Pyruvat Ratio in $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ während der kalten Ischämie und Reperfusion .....	53
4.5.	Ergebnisse der Blutperfusion ohne Leber.....	55
4.5.1.	ASAT- werte der Blutperfusion .....	55
4.5.2.	ALAT-werte der Blutperfusion.....	56
4.5.3.	LDH-werte der Blutperfusion .....	56
4.5.4.	GLDH-werte der Blutperfusion.....	57
4.5.5.	Laktatwerte der Blutperfusion .....	58
4.5.6.	Kaliumwerte der Blutperfusion .....	58
4.5.7.	Natriumwerte der Blutperfusion .....	59
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
5.1.	Diskussion Material.....	60
5.1.1.	Schweineleber .....	60
5.1.2.	HTK und Konservierung .....	60
5.1.3.	Das Perfusat.....	62

5.2.	Diskussion Methoden .....	64
5.2.1.	Operation bis Präperfusion .....	64
5.2.1.1.	Das Operationsprozedere.....	64
5.2.1.2.	Die Einleitung der kalten Konservierungslösung und intraoperative Kühlung .....	64
5.2.1.3.	Die Kanülierung/ Konnektierung der Gefäße .....	65
5.2.1.4.	20 Stunden kalte Ischämie/ Konservierung .....	65
5.2.2.	Reperfusion .....	68
5.2.2.1.	Extrakorporale Leberperfusion (ECLP).....	68
5.2.2.2.	vom Preflush nach 20 Stunden kalter Ischämie zur Reperfusion.....	71
5.3.	Diskussion Ergebnisse .....	74
5.3.1.	Diskussion Laborparameter (Schädigungsparameter).....	74
5.3.2.	Vergleich aller mit Iloprost behandelten Gruppen zur Kontrollgruppe.....	76
5.3.2.1.	Makroskopie und Gewichtszunahme .....	76
5.3.2.2.	Laborparameter ASAT, ALAT, GLDH, LDH.....	77
5.3.2.3.	Glukose in % zur Präperfusion, Laktat.....	79
5.3.2.4.	Elektrolyte (Calcium, Kalium, Natrium) .....	80
5.3.2.5.	Mediatoren (MPO, cGMP) .....	82
5.3.3.	Vergleich zwischen den Iloprost behandelten Gruppen.....	84
5.3.3.1.	Makroskopie und Gewichtszunahme .....	85
5.3.3.2.	Laborparameter ASAT, ALAT, GLDH, LDH.....	85
5.3.3.3.	Glukose in % zur Präperfusion, Laktat.....	86
5.3.3.4.	Mediatoren (MPO, cGMP) .....	87
5.4.	Mikrodialyse.....	87
5.5.	Ideen zur unterschiedlichen Iloprostwirkung in den einzelnen Gruppen ..	91
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>III.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
<b>IV.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>111</b>
<b>V.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>112</b>
<b>VI.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>113</b>

## I. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALAT	Alanin Aminotransferase
ASAT	Aspartat Aminotransferase
bzw. / z.B.	beziehungsweise / zum Beispiel
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
EC	Euro Collins Konservierungslösung
ECLP	Extrakorporale Leberperfusion
Fa.	Firma
h	Stunde
GTP	Guanosintriphosphat
HAES	HAES – steril® 6%
Hif -1 $\alpha$	Hypoxie induzierter Faktor 1 alpha
HTK	Histidin-, Tryptophan-, Ketoglutarate Konservierungslösung
ICAM	Intercelluläres Adhäsionsmolekül
Iloprost	Handelsname: Ilomedin®, Fa. Schering
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP – Kinasen	mitogen activated protein- Kinasen
NF $\kappa$ B	nuclear factor (kappa- light- chain- enhancer) of activated B- Lymphozyten (Transkriptionsfaktor)
NHBD	Non Heart Beating Donors (Herzstillstand-Spender)
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
o.g.	oben genannt
%	Prozent, prozentual
PAF	platelet activating factor
PG	Prostaglandin
Reperf.	Reperfusion
UW	University of Wisconsin- Konservierungslösung
Tab.	Tabelle
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

## II. Abstrakt

Iloprost kann zur Verbesserung des Leberoutcomes von Marginalorganen im Rahmen der Transplantation beitragen. Marginale Organe zeigen eine höhere Rate an Nicht- bzw. Malfunktion. Marginale Organe sind empfindlicher gegenüber dem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Existierende Untersuchungen zeigen einen positiven Effekt von Iloprost auf das Leberoutcome. In den bisher durchgeführten Untersuchungen zu Iloprost und Leberoutcome fehlt bisher der Vergleich zwischen zeitlich verschieden Iloprost behandelten Lebern unter denselben Versuchsbedingungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Schweinelebern explantiert, 20 Stunden in HTK (4°) kalt konserviert, geflushed und in einem etablierten extrakorporalen Perfusionsmodell mit Schweinevollblut acht Stunden (re-) perfundiert. Das Iloprost wurde immer in der gleichen Konzentration, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, verabreicht. Es wurden vier Gruppen à sieben Lebern untersucht. Die Iloprostbehandlung erfolgte durch die Applikation in die Spenderaorta kurz vor der Konservierung (Spendergruppe), durch Zugabe in die Konservierungs (HTK-) lösung (HTK- Gruppe) oder durch die Behandlung des Reperfusats (Reperfusatgruppe) nach 20 Stunden kalter Ischämie während der extrakorporalen (Re-)perfusion. Die Kontrollgruppe stellt die Nichtbehandlung dar.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die Spendergruppe signifikant bessere makroskopische Ergebnisse nach vier und acht Stunden Reperfusion und eine signifikant geringere prozentuale Gewichtszunahme zum Ausgangsgewicht. Des Weiteren ergaben sich signifikant niedrigere ASAT- und LDH- Werte in der Spendergruppe nach vier, sechs und acht Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die HTK- Gruppe zeigte ebenso signifikant niedrigere ASAT- und LDH- werte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach vier, sechs und acht Stunden. Vergleicht man die vor der kalten Ischämie behandelten Gruppen (Spender- und HTK- Gruppe) zur Reperfusatgruppe, so zeigt sich, dass die Spendergruppe signifikant niedrigere ASAT- Werte nach vier Stunden Reperfusion hat und die Spender- und HTK- Gruppe signifikant niedrigere LDH- Werte im Vergleich zur Reperfusatgruppe nach einer halben, vier, acht Stunden Reperfusion haben.

Schlussfolgernd ist die Iloprostgabe vor der kalten Ischämie effektiver. Die hohen Transaminasewerte in der Reperfusatgruppe sind Ausdruck eines ausgedehnten Leberschadens. Betrachtet man die Gesamtheit aller Ergebnisse, sind die

Iloprostwirkungen in der Spendergruppe am effektivsten. Die Konservierungs-lösungsbehandlung ist ebenso effektiv und kann bei Kontraindikationen zur Spenderbehandlung durchgeführt werden. Mit Iloprost ist eine Substanz gefunden, durch die sich mit der Gabe zum richtigen Zeitpunkt marginale Organe effektiv behandeln lassen und sich ein deutlich besseres Outcome gegenüber nicht behandelten marginalen Organen erzielen lässt.

Iloprost may contribute to the improvement of liver Outcomes of marginal organs in the context of transplantation. Marginal organs show a higher rate of non- or dysfunction. Marginal organs are more sensitive to the ischemic and reperfusion injury. Existing studies show a positive effect of iloprost on liver outcome, but no comparison exist between in time differently treated iloprost- treated livers under the same conditions.

In the present study pig livers were explanted, preserved 20 hours in HTK ( 4 °), cold flushed and perfused in an established extracorporeal perfusion system with porcine blood for eight hours. The iloprost was always given in the same concentration but at different points in time. We examined four groups with seven livers each. The iloprost was applied in the donor aorta shortly before preservation (Donor group), by adding it to the preservatives (HTK) - solution ( HTK group) or by given it to the reperfusion solution (Reperfusion group) after 20 hours of cold ischemia during extracorporeal (re)-perfusion. The control group represents the non-treatment group.

As compared to the control group, the donor group showed significantly better macroscopic results after four and eight hours of reperfusion and a significantly lower percentage weight gain in relation to the initial weight. Furthermore, significantly lower ASAT and LDH values were achieved in the donor group after four, six and eight hours compared to the control group. The HTK group also showed significantly lower ASAT and LDH values compared to the control group after four, six and eight hours. Comparing the groups, treated prior to cold ischemia (donors and HTK group), to the reperfusion group, the donor group has significantly lower ASAT levels after four hours of reperfusion and the donor and HTK group showed significantly lower LDH values compared to the reperfusion group after a half, four, eight hours of reperfusion.

Concluding, the iloprost treatment is more effective when given prior to the cold ischemia. The high transaminase levels in the Reperfusion group are an expression of a widespread liver damage. Considering the totality of all results the effects of iloprost for the donor group are most effective. The preservative solution treatment is also effective and can be used in case of contraindications with the donor treatment. Iloprost offers a substance by which marginal organs can be effectively treated, when applied at the right moment in time. It achieves a clearly better outcome as compared to the non-treated marginal organs.



## 1. Einleitung

### 1.1. Einführung

#### Daten zur Lebertransplantation

Die Transplantation ist die wichtigste Therapie zur Behandlung von Patienten mit chronischem oder akutem fulminanten Leberversagen[1]. Geregelt ist sie nach den Richtlinien der Bundesärztekammer gemäß §16 TPG (Transplantationsgesetz).

Nach Eurotransplant ([www.eurotransplant.org](http://www.eurotransplant.org)) wurden im Jahr 2011 1039 Lebertransplantationen in Deutschland durchgeführt.

Die aktive Warteliste ergab bei Eurotransplant im Jahr 2011 eine Anzahl von 2064 Wartenden in Deutschland.

Es ist ersichtlich, dass das Transplantatangebot dem Bedarf nicht gerecht wird.

Die Transplantation von sogenannten marginalen Organen als eine Möglichkeit die Zahl der auf eine Leber Wartenden zu verringern, wird immer wichtiger[2].

Die Transplantation von Marginalorganen ist eine Möglichkeit, die Zahl der Wartenden und Kranken zu minimieren. Eine eindeutige Definition für Marginalorgane ist nicht vollständig etabliert. Marginalorgane sind keine optimalen Spenderorgane [2]. Wie bei Busutil 2003 beschrieben, wird das Optimum einer Spenderleber durch ein erhöhtes Spenderalter, eine verlängerte Ischämie, Non-heart-beating-donors, eine Hypotension des Spenders und eine Steatosis hepatis eingeschränkt.

Marginalorgane weisen als suboptimale Spenderorgane ein höheres Risiko für ein primäres Organversagen auf.

Im Wortlaut der Bundesärztekammer wird von „erweiterten Spenderkriterien“ gesprochen, die der Definition der Marginalorgane gleichkommt. Die spezifizierten erweiterten Spenderkriterien sind in Tabelle C zusammengefasst (siehe Anhang) [3].

„Marginale Organe“ zeigen eine höhere Rate an initialer Nicht- bzw. Malfunktion, sowie ein insgesamt schlechteres Outcome [4].

Die Ischämiezeit ist ein limitierender Faktor für den Erfolg einer Lebertransplantation. Durch die Verwendung von Konservierungslösungen konnte die Ischämiezeit der Leber auf 10 -12 Stunden und mehr verlängert werden. [5-8]

In einem Review Article von Kukan 2001 wird beschrieben, dass bei über 25 % der Lebertransplantatempfänger posttransplantäre Komplikationen wie Gallenstrikturen, sog. ITBL (ischemic type biliary lesions), eine initial schlechte Funktion (initial poor

function) oder sogar eine Nichtfunktion (initial nonfunction) auftreten, wenn die Konservierungszeit mehr als 10-12 Stunden beträgt. Die Retransplantationsrate innerhalb der ersten 3 Monate wird in diesem Artikel von Kukan 2001 mit 30 % angegeben. [9]

In den Richtlinien zur Transplantation (Punkt 5.3.) ist eine kurze Konservierungszeit (kurze kalte Ischämiezeit) für den Erfolg einer Transplantation von funktionseingeschränkten postmortalen Organen von Bedeutung. [10]

Konservierungszeiten von 10-12 Stunden stellen keine Seltenheit dar. So sind in der analytischen Auswertung von klinischen Lebertransplantationen kalte Ischämiezeiten von durchschnittlich 9 Stunden [11] und 11 Stunden (minimal 3,2 und maximal 26,8 Stunden) [12] beschrieben.

Folglich ist der Ischämie/ Reperfusionsschaden, der zum Verlust der Spenderleber führen kann, ein entscheidendes Problem in der Lebertransplantationschirurgie.

Die Suche nach Verbesserungen, um den Ischämie/ Reperfusionsschaden einzuschränken und auch die Funktion marginaler Organe zu erhalten, beschäftigt sich mit ischämischer Prekonditionierung [13], weiterer Verbesserung der Konservierungslösungen, medikamentöser Therapie des Spenders mittels Antioxidantien, Apoptoseinhibitoren und der Frage nach der optimalen Perfusionstemperatur im Rahmen der extrakorporalen Leberperfusion [14].

Da Iloprost (Prostaglandin I<sub>2</sub>- Präparat) eine vasodilatatorische, Thrombozyten aggregationshemmende [15] und zytoprotektive [16] Wirkung hat, scheint es eine geeignete Substanz zu sein, um den Ischämie/ Reperfusionsschaden einer Spenderleber bzw. eines Marginalorgans zu lindern bzw. einzuschränken. Durch einen optimalen Iloprost - Einsatz könnte der Ischämie/ Reperfusionsschaden abgemildert werden.

## **1.2. Die Leber**

*Anatomie:* Die Leber ist ein intraabdominal, dem Zwerchfell dicht anliegendes Organ. Sie ist das zentrale Stoffwechselorgan und gilt als größte Drüse des Körpers.

*Leberfunktion:* Die Leber hat vielfältige Aufgaben. Während der Embryonal-/ Fetalzeit ist sie beteiligt an der Hämatopoese. Sie ist ein Stoffwechselorgan. Oxidationsvorgänge, Konjugationsvorgänge, Immunmodulatorische Vorgänge finden

in der Leber statt. Sie hat neben der Bildung und Abgabe bestimmter Proteine (z. B. Blutgerinnungsfaktoren, Albumin) ins Blut auch Speicherfunktionen (z.B. Vit B12, Eisen, Glykogen).

Als exokrine Drüse produziert die Leber Galle. „Die pro Tag über den Dct. Choledochus in den Dünndarm gelangende Galle beträgt bei Mensch und Schwein 0,5- 1 l/Tag“ [17]. Der Harnstoffzyklus findet in der Leber statt.

Eine Leberschädigung ist makroskopisch, mikroskopisch, funktionell und/oder laborchemisch feststellbar.

### **1.3. PGI2 und die extrakorporale Leberperfusion**

In einem extrakorporalen System untersuchte schon Wolf die Effekte von Epoprostenol und Norepinephrine auf die Hämodynamik der Leber[18].

Da die extrakorporale Perfusion ein Modell zur Untersuchung pharmakologischer Fragen ist[19-22], lässt sich im extrakorporalen Perfusionskreislauf der Einfluss von PGI2 auf die Leber unabhängig von anderen Organsystemen kontrolliert untersuchen.

### **1.4. Ableitung der Aufgabenstellung, Hypothese und Studienendpunkte**

Es fehlte bisher der Vergleich des Leberoutcomes zwischen zeitlich verschieden PGI2- behandelten Lebern unter denselben Versuchsbedingungen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Iloprost den Ischämie/ Reperfusionsschaden minimieren kann und zu welchem Zeitpunkt die PGI2 - Gabe erfolgen sollte, um den Ischämie/ Reperfusionsschaden der explantierten, reperfundierten Schweineleber einzuschränken.

Bewusst wurde ein Modell mit als marginal anzusehenden Spenderlebern (20 Stunden kalte Ischämiezeit) gewählt, um die potentiell protektive Wirkung des PGI2 auf den Initialschaden der Leber in der extrakorporalen Perfusion zu untersuchen. Es wurde folgende Hypothese aufgestellt:

- *Die Behandlung mit PGI2 im Rahmen der Explantation und extrakorporalen Reperfusion der Schweineleber reduziert den Ischämie-Reperfusionsschaden.*

Zur Überprüfung dieser Hypothese und Beurteilung des optimalen Behandlungszeitpunktes wurden folgende Endpunkte untersucht:

1. Makroskopische Ergebnisse und Gewichtszunahme
2. Laborchemische Bestimmungen (Transaminasen, GLDH, LDH, Glukose, Laktat, Elektrolyte)
3. Bestimmung von Mediatoren (cGMP, MPO)
4. Mikrodialyse-Daten (Glukose, Glycerin, Laktat, Pyruvat)

## **2. Material und Methoden**

Die Versuche wurden in Einklang mit den regionalen Tierversuchsbestimmungen als „Organentnahme in tiefer Narkose“ durchgeführt.

In dieser Untersuchung wurden Schweinelebern unter sterilen Bedingungen in Narkose explantiert, 20 Stunden kalt konserviert und anschließend extrakorporal mit autologem Schweineblut acht Stunden reperfundiert. Die Konservierung erfolgte mit HTK- Lösung.

Das Prostaglandin I<sub>2</sub> (Iloprost) wurde stets in derselben Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten verabreicht.

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Tiere und Tierhaltung**

Für diese Arbeit wurden 10 -16 Wochen alte Schweine der deutschen Landrasse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 23,52 (+/- 1,6) kg verwendet.

Vom Bauernhof kommend erfolgte die Unterbringung in der Tierhaltung der tierexperimentellen Einrichtung im Forschungshaus des Virchow - Klinikums (Charité Berlin). Während des gesamten Aufenthalts erfuhren die Schweine eine intensive Betreuung durch Tierärzte und Tierpfleger. 12 Stunden vor der Explantation blieben die Tiere nüchtern.

### **2.1.2. Die Konservierungslösung – HTK – Lösung**

Die HTK (Histidin, Tryptophan, Ketoglutarat) - Konservierungslösung, eingeführt durch H.J. Brettschneider besitzt eine geringe Viskosität und wird zur Konservierung abdominalen Organe verwendet. In diesem Experiment wurde Custodiol® (HTK-Lösung) vom Hersteller Dr. F. Köhler Chemie GmbH (Alsbach-Hähnlein, Deutschland) verwendet. Die Bestandteile sind im Anhang in Tabelle D aufgeführt.

### **2.1.3. Das Perfusat**

Das Perfusat bestand aus 2000 ml Vollblut von Schweinen der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung in Ruhlsdorf/Groß Kreutz in 14513 Teltow, 500ml 6% HAES (siehe Tabelle F) und 1500 ml Dialysat-Lösung (siehe Tabelle G). Vor Anschluss der Leber ans Perfusionssystem wurden 4000 ml Perfusat ins Sammelgefäß gegeben, 10.000 IE Heparin, 40 mg Tobramycin hinzugefügt und die Zirkulation, Oxygenierung sowie Erwärmung gestartet.

Nach vierstündiger Leberreperfusion wurden dem Perfusat weitere 10.000 IE Heparin und 40 mg Tobramycin hinzugefügt.

Die 2000 ml Schweineblut für die extrakorporale Leberperfusion stammen von Schweinen, deren A. carotis und V. jugularis direkt nach der Tötung (durch Elektroschock) im Schlachthof Teltow eröffnet wurde und je 2000 ml Blut in einer sterilen Plastikflasche aufgefangen wurden. Dem gewonnenen Blut wurden 5.000 IE Heparin sowie 10 mg Tobramycin hinzugefügt.

Angesichts der vier Perfusionen pro Woche wurden acht Liter Schweineblut von Teltow ins Virchow - Klinikum (Charité Berlin) transportiert. Der Transport des allogenen Schweineblutes zum Virchow - Klinikum erfolgte in sterilen Plastikflaschen auf Eis in einer Kühlbox. Anschließend wurde es bei 4°C gelagert und für die wöchentlichen Perfusionen (pro Perfusion jeweils 2 l) verwendet.

Um die Veränderungen des Blutes unter extrakorporalen Perfusionsbedingungen zu analysieren, wurden drei Blutperfusionen ohne Leber mit den gleichen Druck- und Flussverhältnissen wie für die Leberperfusion durchgeführt. Die Analysen beschränkten sich auf die Parameter, die während der Leberperfusion untersucht wurden (siehe unten).

Tobramycin in Form des TOBRA-cell™ 40 mg/ml ( Lösung ) ist ein Antibiotikum vom pharmazeutischen Unternehmer cell pharm GmbH, Feodor-Lynen-Strasse 23, 30625 Hannover, Deutschland.

Heparin als Antikoagulant wurde in Form des Liquemin™ von dem pharmazeutischen Unternehmer Hoffmann-La-Roche AG, Emil – Barell – Straße 1, 79693 Grenzach –Wyhlen, Deutschland hinzugefügt.

#### 2.1.4. Iloprost

Iloprost in Form des Ilomedin™ Firma Schering (Bayer), Berlin, Deutschland ist ein Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) – Präparat. Der Name „Prostaglandin“ wurde durch von Euler 1933 in Schweden geprägt, der annahm, dass Prostaglandine nur von der Prostata (engl.: prostate gland) gebildet werden. Da sehr viele Prostaglandine unterschieden werden [23], hat das PGI<sub>2</sub> nach Moncada und Vane[24] den Namen Prostacyclin, in stabiler Form Epoprostenol, erhalten. Es ist der endogen wirksamste Thrombozytenaggregationshemmer [23]. Weiterhin hat es eine vasodilatatorische Wirkung.

Die Strukturformel von Iloprost, dem PGI<sub>2</sub>- Präparat ist in Abb.1 dargestellt.

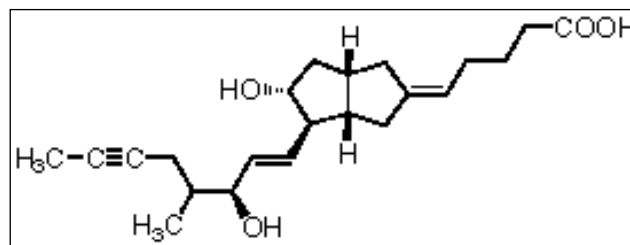


Abbildung 1 Strukturformel Iloprost [25]

#### Pharmakodynamik, Pharmakokinetik

PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin) ist ein Abkömmling der Arachidonsäure. Beim Menschen katalysiert die Cyclooxygenase die Bildung von PGH<sub>2</sub> aus der Arachidonsäure. Aus dem PGH<sub>2</sub> wird unter Einfluss einer Prostaglandin- Synthetase das PGI<sub>2</sub> gebildet

(Die Cyclooxygenase ist gleichzeitig das Enzym, das die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> und Leukotrienen aus der Arachidonsäure katalysiert).

Das PGI<sub>2</sub> ist ein instabiles Molekül mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Prostacyclin wird rasch biotransformiert. Es ist 30 - fach potenter als PGE<sub>1</sub> [24]. Iloprost, als PGI<sub>2</sub>-Derivat, zerfällt spontan zu 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> [26, 27].

Iloprost hat einen vasodilatatorischen Effekt, hemmt signifikant die Plättchenaggregation [15, 28] und senkt die Chemotaxis. [15, 23] Es besitzt eine fibrinolytische Aktivität [15, 23]. Dem Iloprost wird eine cytoprotektive Eigenschaft [15, 16] zugeschrieben. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt (Fachinfo Schering Austria). Weitere Ausführungen zu Iloprost sind in der Dissertationsschrift von Edda Klotz, 2011 beschrieben [25].

### Pharmakokinetische Eigenschaften

10 - 20 Minuten nach Beginn der intravenösen Iloprost - Infusion wird ein steady state erreicht. Die Höhe des Wirkstoffspiegels im steady state hängt linear von der Infusionsrate ab. Es folgt eine schnelle Metabolisierung. Die Halbwertszeit der terminalen Dispositionsphase aus dem Plasma beträgt 0,5 h.

Oral gegeben erreichen nur 20 % PGI<sub>2</sub> den systemischen Kreislauf. Es wird über die β-Oxidation metabolisiert.

70 % werden renal ausgeschieden, fäkal nur 12-17 %. Die totale Clearance beträgt 20 ml/min/kg (Fachinformation Schering Austria).

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Sedation, Narkose und intraoperative Überwachung**

Die Narkosedurchführung erfolgte durch einen Tierarzt der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum.

Die Sedation der Versuchstiere erfolgte mit 4 - 6 mg Azaperon (Stresnil®, Fa. Janssen) per kg Körpergewicht, 10 mg Ketamin (Ursotamin®, Fa. Serumwerk Bernburg AG) per kg Körpergewicht und 0,05 mg Atropin per kg Körpergewicht (KG) intramuskulär.

Anschließend wurde die Narkose der Tiere mit Etomidat (Etomidat - Lipuro®, Fa. B. Braun, Melsungen) (0,25 - 0,5 mg/kg Körpergewicht) eingeleitet.

Bei Bedarf wurde vor Intubation Thiopental (Trapanal®) 5 -10 mg /kg Körpergewicht intravenös gegeben.

Es erfolgte die Intubation. Zur Muskelrelaxation wurden 4mg Pancuroniumbromid intravenös injiziert.

Die Inhalationsnarkose setzte sich aus 40% O<sub>2</sub>, 60% N<sub>2</sub>O und ca. 1,5 % – 1,8 % Isofluran zusammen. Als Geräte dienten der Ventillog Capnolog Sulla 800 V, Drägerwerk Lübeck, Deutschland sowie ein Schlauchsystem von Dräger® (Lübeck, Deutschland).

Nach Bedarf wurden Repetitionsgaben zur Muskelrelaxation mit 2 - 4 mg Pancuroniumbromid verabreicht.

Die Tiere erhielten intraoperativ eine Beatmung mit einem Atemzugvolumen von 10-15 ml/kg Körpergewicht, einem Beatmungsdruck von ≤ 20 - 25 cm H<sub>2</sub>O und einem ange-strebt EtCO<sub>2</sub> zwischen 32 - 36 mmHg. Zur Überwachung des expiratorischen Volumens, des Beatmungsdruckes, der O<sub>2</sub> - Konzentration dienten der Siemens Ventilator 711 und der Siemens Flowmeter (O<sub>2</sub> / Air/ N<sub>2</sub>O) Unit 770, Deutschland.

### **2.2.2. Die Operation**

Nachdem die Schweine dem Standard entsprechend narkotisiert worden waren, begann die Operation unter sterilen Bedingungen. Alle Organexplantationen erfolgten durch das gleiche Operationsteam. Es setzte sich zusammen aus einem mit der Organex- und transplantation erfahrenen Chirurgen, unterstützt durch Doktoranden.

Es erfolgte eine Laparotomie per Medianschnitt beim Schwein in Rückenlage mit anschließendem Einsetzen eines Bauchsperrers. Nach Aufsuchen des Dct. Cysticus wurde dieser ligiert und die Cholezystektomie durchgeführt.

Zur Messung der intraoperativ und später extrakorporal im Perfusionskreislauf produzierten Galle kanülierte der Operateur den Ductus choledochus mit einer ‚Heidelberger Verlängerung‘. Diese Verlängerung führte intraoperativ in ein Auffanggefäß zur Sammlung der Galleflüssigkeit.

Anschließend erfolgte die Freilegung/Präparation der distalen (infrarenalen) Aorta abdominalis und der V. cava inferior kurz vor Abgang der Iliacal-gefäße (unter Weghalten/ Hochklappen des Darmes).



Die proximale Aorta abdominalis wurde dorsal der Leber und des Magens in Höhe des Hiatus aorticus aufgesucht. Mit Perforation des Zwerchfells und Freilegung des Gefäßes konnte eine Ligatur zum späteren Verschluss der proximalen Aorta vorgelegt werden.

Nach Präparation der großen Gefäße erfolgte die Vollheparinisierung des Tieres. Nach Ligatur der distalen, infrarenalen Aorta mit simultaner Ankopplung/Konnection derselben (cranial der Ligatur) ans luftleere, HTK gefüllte Infusionssystem wurde die proximale Aorta verschlossen und die Kaltperfusion über die distale Aorta retrograd gestartet. Unmittelbar danach wurde die distale V.cava inferior ligiert und eröffnet.

### **2.2.3. Die Konservierung**

Als Perfusionslösung dienten 1000 ml kalte (4°C) HTK - Lösung. Diese flossen hydrostatisch passiv mit einem Druck von ca. 150 cm Wassersäule intraarteriell retrograd ein und perfundierten somit alle Abdominalorgane zwischen der distalen und proximalen Ligatur der Aorta abdominalis (zwischen Diaphragma und vor Abgang der Iliacalgefäße, caudal der renalen Gefäße).

Intraoperative Kühlung: Mit Einleitung der Konservierungslösung wurden zusätzlich zwei Liter 4°Celsius kalte isotone Natriumchloridlösung ins Abdomen gegeben, um die intraabdominal liegenden Organe zu kühlen und die warme Ischämie auf ein Minimum zu reduzieren.

Nach Beendigung des Einlaufs der HTK - Lösung wurde die V. cava von distal bis zu den Abgängen der Nierenvenen präpariert.

Die V. portae, A. gastroduodenalis, V. lienalis wurden in Orientierung zum Pankreas dargestellt. Anschließend erfolgte die Präparation der Aorta vom Abgang der Iliacalgefäße bis zu den Nierenarterien.

Vom Hiatus aorticus durch das perforierte Zwerchfell wurde die Aorta nach distal bis einschließlich des Truncus coeliacus dargestellt. In Orientierung zum Zwerchfell und zum Pankreas wurde die kalt perfundierte Leber präpariert und mit der dargestellten Aorta, V. portae, V. cava sowie dem Dct. choledochus explantiert, anschließend gewogen und in einem sterilen Gefäß mit kalter HTK - Lösung konserviert, auf Eis gelagert.

Es folgten Leberbiopsien, die Implantation einer Gewebesonde zur Mikrodialyse-Messung (CMA Microdialysis, Sweden) (s. Punkt 3.4.) und das Einknoten von Konnektoren in die A. hepatica & V. portae für die spätere extrakorporale Perfusion.

Die Operationsdauer, einschließlich der Biopsien, Kanülierung/Konnektierung der Gefäße und Sondenimplantation betrug im Mittel 52+/-5 min.

Die Aufbewahrung der in kalter HTK konservierten Leber erfolgte in einem sterilen, geschlossenen Gefäß bei 4°C für 20 Stunden. Über die implantierte Gewebesonde wurden per Mikrodialyse in den ersten 6 Stunden der kalten Ischämie Proben entnommen (siehe Mikrodialyse Punkt 3.4.).

#### **2.2.4. Das Perfusionsmodell**

Die Perfusionsapparatur bestand aus zwei Rollerpumpen (Fa. Stöckert, München, Deutschland), wie sie in Herz-/Lungenmaschinen eingesetzt werden. Die Sauerstoffversorgung des Perfusats aus einer Sauerstoffflasche erfolgte über einen Membranoxygenator (Firma Jostra®, Polystan Safe Mini pediatric perfusion, priming volume 90 ml, Blutfluss zwischen 300-2300 ml/min), der sich aus dem eigentlichen Membranoxygenator und einem Reservoir mit Wärmeaustauscheinrichtung zusammensetzte.

Weitere Bestandteile waren ein Sammelgefäß, in der die Leber frei in der Perfusionslösung schwamm, ein Silikon - Schlauchsystem mit Konnektoren zur Verbindung der Elemente sowie ein Wärmetauscher (Fa. Stöckert, München, Deutschland) zur Erwärmung des Systems.

Die permanente/exakte Druck-, Fluss- und Widerstandskontrolle der A. hepatica erfolgte über eine Druckmesseinheit, wie sie bei Heise 1999 und 2003 beschrieben wurde [29, 30].

Die perfundierte Leber schwamm frei in einem Sammelgefäß, umgeben von Perfusat. Eine Rollerpumpe (Pumpe 1) transportierte Perfusat vom Sammelgefäß zum Reservoirbehälter.

Aus dem mit Perfusat gefülltem Reservoirbehälter erfolgte die Perfusion der V. portae hydrostatisch passiv.

Die Höhendifferenz des Flüssigkeitsspiegels im Reservoirbehälter zum Leberhilus ergab einen Perfusionsdruck von 20 cm Wassersäule. Über die Pumpe 1 konnte der Perfusatspiegel im Reservoir bei 20 cm Wassersäule konstant gehalten werden.

Eine zweite Rollerpumpe (Pumpe 2) wurde zwischen den Reservoirbehälter und den Membranoxygenator geschaltet. Der Oxygenator wurde mit 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid persuffliert.

Der Blutfluss konnte zwischen dem Reservoir und dem Oxygenator durch die Pumpe 2 überwacht und konstant gehalten werden.

Das oxygenierte Blut floss weiter durch das Schlauchsystem zur A. hepatica. Die permanente/exakte Druck-, Fluss- und Widerstands- kontrolle der A. hepatica erfolgte über eine Druckmesseinheit, die zwischen Membranoxygenator und A. hepatica geschaltet wurde (Konstante Sauerstoffzufuhr von 0,8 l/min, Kohlendioxid: 0,15 l/min zum System). Damit wurden die Oxygenierung und eine druckkontrollierte Perfusion der A.hepatica mit einem Mitteldruck von 60 - 80 mmHg gewährleistet.

Die Flussrate durch Pumpe 1 lieferte unabhängig der portalvenösen und arteriellen Perfusion den Wert des Gesamtdurchflusses durch die Leber. Der Abfluss aus den Vv. hepaticae erfolgte passiv ins Sammelgefäß.

Für die Konstanthaltung der Perfusatemperatur bei 40°C wurden der Reservoirbehälter sowie der Membranoxygenator an den Wärmetauscher angeschlossen (siehe Abbildung 2).

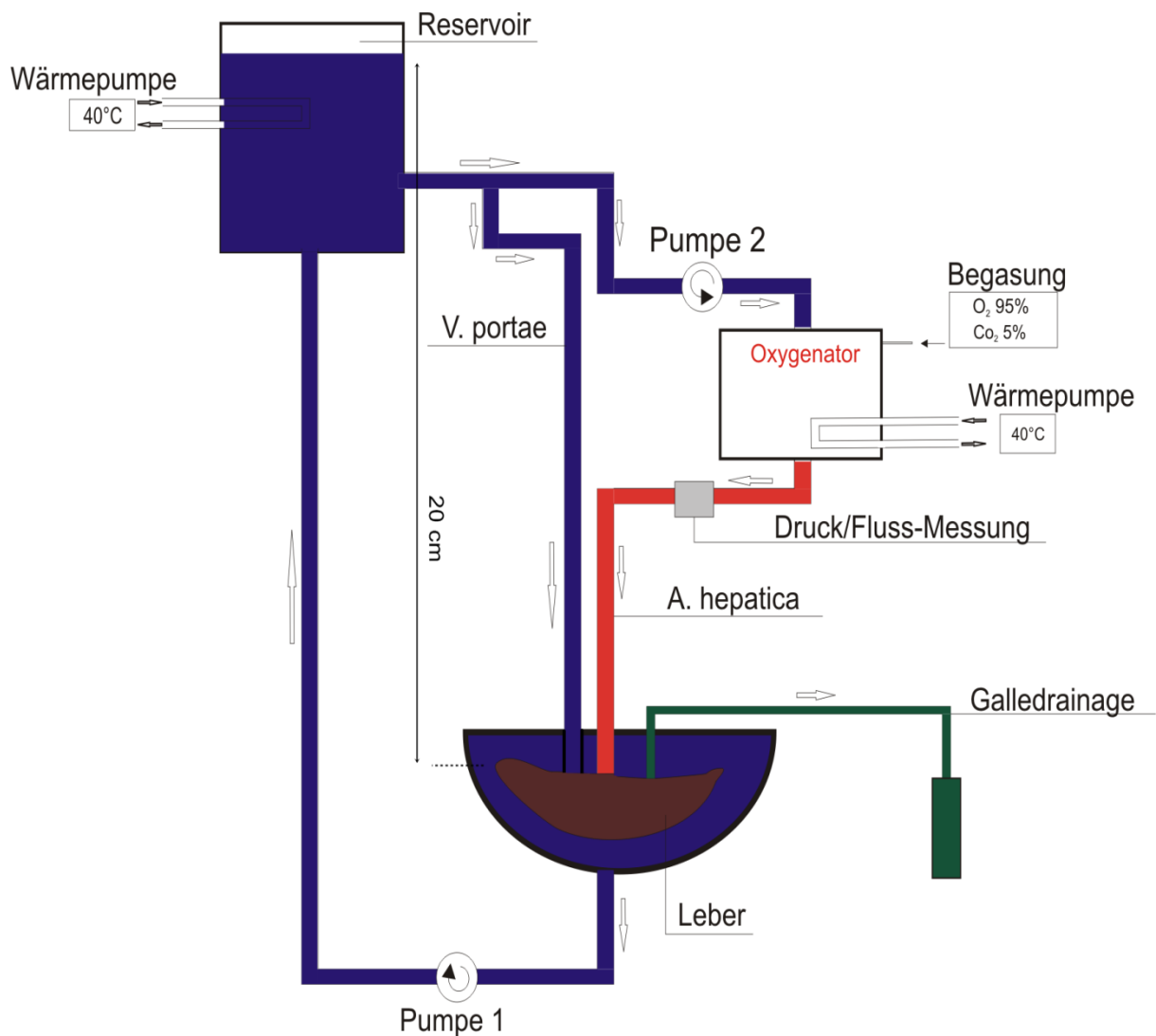


Abbildung 2 Perfusionsmodell

### 2.2.5. Die Organperfusion

Nach genau 20 h kalter Ischämie wurde die in HTK konservierte Leber gewogen und mit 1 ml Dialysat/g Lebergewicht über die V. portae gespült.

Anschließend erfolgte eine Gewebeprobeentnahme und der Anschluss der Leber über die V. portae, dann A. hepatica an den Perfusionskreislauf. Mit Anschluss der Leber an den Perfusionskreislauf begann die druckkontrollierte, extrakorporale Perfusion. Sie dauerte acht Stunden an.

Verbliebene Gefäßäste, Gefäßwandschäden am Truncus coeliacus/A. hepatica, über die nach Anschluss ans Perfusionssystem eine Entlüftung stattfinden konnte, wurden in der ersten halben Stunde ligiert, um den optimalen Blutfluss und eine optimale Leberversorgung zu garantieren.

Die Galle wurde über die intraoperativ gelegte Heidelberger Verlängerung aus dem Dct. choledochus in ein Auffanggefäß abgeleitet. Die Galleproduktion konnte mit dem Beginn der Leberperfusion gemessen werden.

### **2.3. Die Versuchsgruppen**

Untersucht wurden vier Gruppen (sieben Lebern pro Gruppe), die alle den gleichen Operations-, Konservierungs- und Perfusionsbedingungen unterlagen. Die Besonderheiten der einzelnen Gruppen sind:

#### **Gruppe 1 (Kontrollgruppe) n= 7 keine Iloprostbehandlung**

Die sieben Lebern unterlagen keiner Behandlung mit Iloprost.

#### **Gruppe 2 (Spendervorbehandlung = Spendergruppe) n= 7**

1,25 ml Iloprost (20µg) wurden intraoperativ vor dem Kaltperfusionsstart direkt in die Aorta abdominalis (in Höhe des Hiatus aorticus) injiziert.

#### **Gruppe 3 (Behandlung der Konservierungslösung = HTK- Gruppe) n= 7**

1,25 ml Iloprost (20µg) wurden der HTK (Histidin-Tryptophan- Ketoglutarate) – Lösung (Kaltperfusionslösung) vor der intraoperativen, intraaortalen Einleitung zugefügt.

#### **Gruppe 4 (Behandlung des Reperfusats/ Reperfusatgruppe ) n= 7**

Die 1,25 ml Iloprost (20µg) wurden in der achtstündigen Reperfusionsphase kontinuierlich über einen Perfusor ins Perfusionssystem eingeleitet.

In der Kontrollgruppe betrug die Gesamtzahl n= 11, in der Spendergruppe n= 11 und in der HTK-gruppe n= 9. Da in diesen Gruppen bei einzelnen Versuchen maschinelle, technische Zwischenfälle während der Reperfusion auftraten, bei denen viel Blut verloren ging bzw. die Sauerstoffversorgung nicht gewährleistet war, wurden hier die Standardbedingungen nicht erfüllt und diese Organe wurden aus dem Gruppenvergleich und jeglicher Auswertung ausgeschlossen.

Somit wurden in jeder Gruppe jeweils 7 Lebern untersucht.

### 3. Auswertung

#### 3.1. Makroskopie und Gewichtszunahme

Es erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Leber mit einem semiquantitativen Score. Die makroskopische Beurteilung erfolgte durch das o.g. Untersucherteam. Der Score setzt sich aus Farbe, Konsistenz und Perfusion der Schweineleber zusammen. Die Punkteverteilung ist hier tabellarisch dargestellt:

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

**Tab.1 semiquantitativer Score zur Beurteilung der Schweineleber**

Die Summe der drei Kriterien ergibt die makroskopische Leberbeurteilung, z. B. hat eine makroskopisch weiche, rosige, homogen perfundierte Leber die beste makroskopische Beurteilung mit der niedrigsten Summe 3.

Die höchste Summe 12 steht für eine > 50 % inhomogen perfundierte, > 50 % fleckige, harte Leber.

#### Gewichtszunahme

Um eine Aussage zum Gesamtorgan zu treffen, wurde jede Leber nach Explantation, nach 20 h kalter Ischämie und nach erfolgter Reperfusion (8h) gewogen.

#### 3.2. Laborchemische Bestimmungen

Die Bestimmungen von ASAT (Aspartat - Aminotransferase), ALAT (Alanin - Amino - Transferase), GLDH (Glutamatdehydrogenase), LDH (Laktatdehydrogenase), Glukose und Laktat erfolgten eine halbe Stunde nach Anschluss der Leber ans Perfusionssystem sowie nach zwei, vier, sechs, acht Stunden der extrakorporalen Reperfusion.

Das Perfusat wurde in ein Heparin - Plasma - Röhrchen über einen im Schlauchsystem eingesetzten 3-Wege- Hahn abgenommen.

ASAT, ALAT, GLDH, Glukose, Laktat wurden vom Zentrallabor des Virchow – Klinikums (Charité Berlin) auf dem Roche Modular™ (Firma Roche, Hauptsitz Schweiz bestimmt).

Die Angaben der Enzyme (ASAT, ALAT, LDH, GLDH) erfolgte in U/l. Die Glukose und das Laktat wurden in mg/dl angegeben.

Regelmäßige (Effluat, Präperfusion, 2, 4, 6, 8 Stunden) Blutgasanalysen (pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> in mmHg) mit gleichzeitiger Elektrolytbestimmung (Natrium, Kalium, Calcium in mmol/l) erfolgten auf dem Radiometer ABL 505 A/S (Kopenhagen, Dänemark).

Das prozentuale HbO<sub>2</sub> wurde auf dem Hemoximeter OSM 3 Radiometer A/S (Kopenhagen, Dänemark), das mit dem ABL 505 verbunden ist, bestimmt.

Das Effluat entstand durch das Spülen der Leber nach 20 Stunden kalter Ischämie. Die Präperfusionswerte sind die Natrium-, Kalium-, Calciumwerte des Perfusats vor Anschluss der Leber ans Perfusionssystem.

### **3.3. Bestimmung von Mediatoren**

#### **3.3.1. cGMP (cyklisches Guanosinmonophosphat)**

Die cGMP-bestimmung erfolgte mit einem Immunassay, dem (low pH) immunoassay catalog N° DE0550, der R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland, der einem ELISA gleicht.

Voraussetzung für den Test ist EDTA – Plasma (EDTA bindet doppelt- ionisiertes Calcium (Ca<sup>2+</sup>) und stoppt die Phosphodiesterase-aktivität).

Die Einfrierung der EDTA - Plasmaproben bis zur Testdurchführung erfolgte bei -80 °C. In der Arbeit von Finter 2004 erfolgt die cGMP-bestimmung mit dem gleichen Test nur anhand von Gewebeproben [144].

Ablauf des Tests: Alle Reagenzien und Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht, anschließend die Standards vorbereitet (total Activity (TA), non-specific binding (NSB), Maximum Binding (B<sub>0</sub>), Substrate blank (= Qualitätskontrolle)).

Es folgte das Acetylierungsverfahren: 15µl Acetylierungsreagenz wurden zu 300µl des Standards, der Proben oder 0,1 N HCl gebracht und für 2 Sekunden gevortext (geschüttelt). Voraussetzung des Tests ist der Verbrauch der acetylierten Standards und der Proben in 30 Minuten der Präparation.

Zur Testdurchführung sind folgende Reagenzien notwendig:

Mikroplatte: 96 Vertiefungen, die mit einem polyklonalen Antikörper überzogen sind  
cGMP Konjugat - 5ml cGMP konjugated an alkalischer Phosphatase, mit blauem Farbstoff und Konservierungsmittel

cGMP Standard - 0,5ml cGMP (5000 pmol/ml) im Puffer, mit Konservierungsmittel

cGMP Antikörper Lösung - 5ml polyklonale Kaninchen Antikörper cGMP, mit gelbem Farbstoff und Konservierungsmittel

HCL - 30 ml 0,1N HCl ( Salzsäure)

Neutralisationsreagenz- 6ml Puffer mit rotem Farbstoff und Konservierungsmittel

Waschpufferkonzentrat- 30 ml einer 10-fach konzentrierten Lösung eines gepufferten Tensids mit Konservierungsmittel

pNPP Substrate - 20ml p-Nitrophenylphosphat in einer gepufferten Lösung,

Stop lösung - 6ml Trinatriumphosphat,

Triethylamine, Essigsäureanhydrid

Prozedere: Man nehme die Mikroplatte und gebe 50µl Neutralisationsreagenz in jede Vertiefung (außer TA und Substrate Blankos), 150µl 0,1N HCl zum NSB well, 100µl 0,1N HCl zum Zero Standard (B0), 100µl vom Standard oder der Probe zu den einzelnen Vertiefungen, 50µl cGMP Konjugat zu jeder Vertiefung (außer TA und Substrate Blankos),

50µl cGMP Antikörper Lösung in jede Vertiefung außer TA, NSB und Substrat Blankos , dann 2h Inkubieren bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

Waschen der Proben mit dem Waschpufferkonzentrat für dreimal. Anschließend 5µl cGMP Konjugat zum TA geben, es tritt eine Farbreaktion auf.

200µl pNPP Substrate zu jeder Vertiefung hinzufügen und für eine Stunde bei Raumtemperatur (nicht schütteln) inkubieren. Zum Ende 50µl Stopp lösung zu jeder Vertiefung hinzugeben.

Es erfolgt die Messung der optischen Dichte bei 405 nm auf dem Mikroplattenleser.

Die Standardkurve und Messwerte sind umgekehrt proportional, je geringer die optische Dichte, desto höher ist die Konzentration. Die cGMP Konzentration wurde in pmol/ml angegeben.

cGMP- Daten wurden für die erste halbe; vierte und achte Stunde nach Reperfusion erhoben.



### 3.3.2. MPO (Myeloperoxidase)

Die MPO- bestimmung erfolgte mit einem Myeloperoxidase-Assay über eine photometrische Aktivitätsmessung.

Aus den -80° C gekühlten Gewebeproben wurde MPO bestimmt. Es erfolgte die Gewebevorbereitung, MPO-messung über die Spektralphotometrie und die Proteinmessung. Die MPO- bestimmung erfolgte nach Laborstandards der Abteilung für Transplantationschirurgie und ist ebenso in den Arbeiten von Vachenauer und Coym beschrieben[31, 32].

#### Gewebevorbereitung

Für jede Probe benötigt man 2ml 0,05 M KPE (Kaliumdihydrogenphosphat)-Puffer pH 6,0 versetzt mit 0,5% HTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid).

Von dem kryokonserviertem Gewebe werden 100-150mg eingewogen, in einem Röhrchen mit obigem Mix unter Verwendung eines Ultra-Turrax dismembriert, die Einwaagen notiert (Zwischenspülen mit aqua dest.), die Proben weiter verarbeitet. Die Proben werden 15 min bei 3500 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

1 ml des Überstandes wird in Eppendorfgefäße pipettiert und zwei Stunden bei 60° C inkubiert.

Anschließend lässt man die Proben abkühlen und zentrifugiert erneut für zwei Minuten bei 15000 g in einer Eppendorfszentrifuge. Die Überstände werden für die MPO-bestimmung verwendet.

Die Messung erfolgt in einer Mikrotiterplatte in Abgleichung zum Standard und Leerwert. Zur Probe werden 25µl TMB (3,3,5,5-Tetramethylbenzidine) –Lösung und 190µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt, gemischt (es entsteht eine Blauverfärbung) sowie bei 3°C 5min inkubiert. Es erfolgt die Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M). Die Proben verfärben sich gelb.

Die Extinktionsänderung wird bei 450nm im Photometer gemessen.

#### Vorbereitung für die Proteinmessung :

Der Rest der Probe wird zur Proteinbestimmung verwendet. Hierzu wird das Protein mit 300µl HClO<sub>4</sub> ausgefällt, gevortext und erneut zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wird verworfen bzw. notfalls abpipettiert und das Pellet zur weiteren

Bestimmung gewaschen. Für die Proteinbestimmung werden 20µl Probe, Standard und Leerwert in eine Mikrotiterplatte pipettiert.

Zu den Proben werden 300 µl BCA- CuSO<sub>4</sub>- Mischung (Bichinonic Acid Reagenz- Kupfersulfat) hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wird abgedeckt und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Die photometrische Messung erfolgt nun bei 562 nm.

Die Ergebnisse sind in mU (MPO)/mg (Protein) angegeben. Die MPO- daten wurden für zwei Zeitpunkte erhoben; direkt postoperativ und nach acht Stunden Reperfusion.

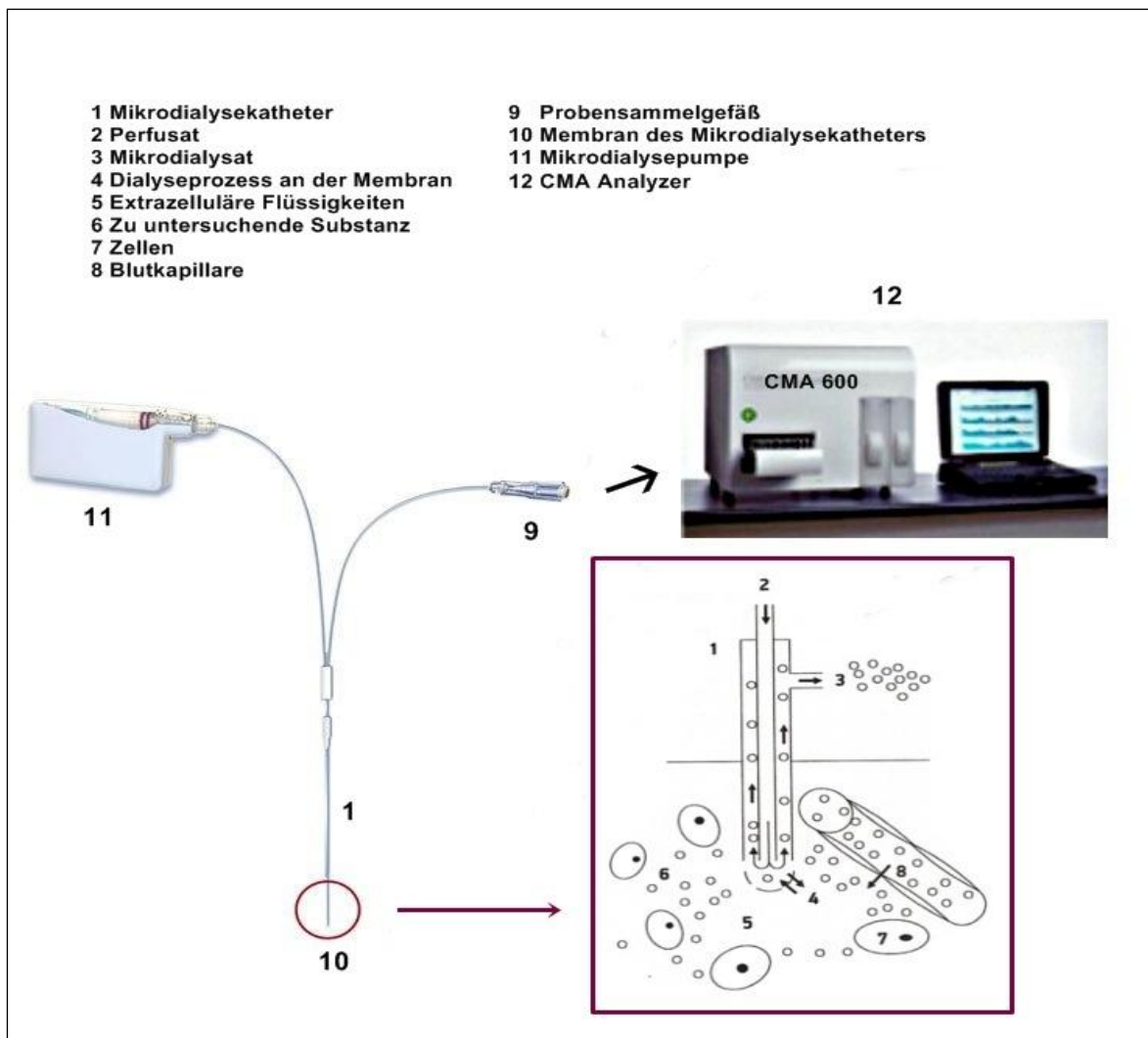
### **3.4. Mikrodialyse (MD)**

#### Methode:

Mit der Implantation eines Mikrodialysekatheters (CMA 61 Liver MD Catheter, CMA Microdialysis AB, Stockholm, Schweden) ins Lebergewebe direkt nach der Explantation wurde über ein Mikrodialyseverfahren Interzellularflüssigkeit des Lebergewebes in einem Probengefäß (sog. „Vial“) gesammelt.

Die Mikrodialysesonde besteht aus einem konzentrischen Doppelkatheter und einer Mikrodialysekammer, die von einer semipermeablen Membran umgeben ist. Die Sonde wird mit Hilfe einer Hohlnadel in das Gewebe eingebracht. Angetrieben von einer Mikrodialysepumpe strömt das isotonische Perfusat (Fluss 3µl/min) (Ringer-Laktatlösung) über den Einstromkatheter in die Mikrodialysekammer und den interstitiellen Raum. Gleichzeitig diffundieren die Substrate nach dem Fick'schen Prinzip aus dem Interstitium entlang dem Konzentrationsgefälle durch die Membran in das Perfusat. Das so mit Substraten angereicherte, gewonnene Perfusat fließt über den Ausstromkatheter zurück in ein Probensammelgefäß („Vial“).

[33-35](siehe Abbildung 3).



**Abb. 3 Aufbau des Mikrodialysesystems (modifiziert nach CMA Microdialysis) Dialyseprozess an der Membran (nach Zeitlinger et al. 2005)[132]**

Messung:

Das Vial wurde alle 30 min gewechselt. Die Bestimmung der Glukose-, Laktat-, Glycerin- und Pyruvatkonzentrationen in der Lebergewebsflüssigkeit erfolgte über den CMA 600 Microdialysis Analyser für die ersten sechs Stunden der kalten Ischämie und die acht Stunden Reperfusion.

Die Konzentrationsangaben erfolgten in mM. Mikrodialyseuntersuchungen erfolgten nur in der Kontroll-, Spender- und HTK- Gruppe für jeweils fünf Schweine (n= 5).

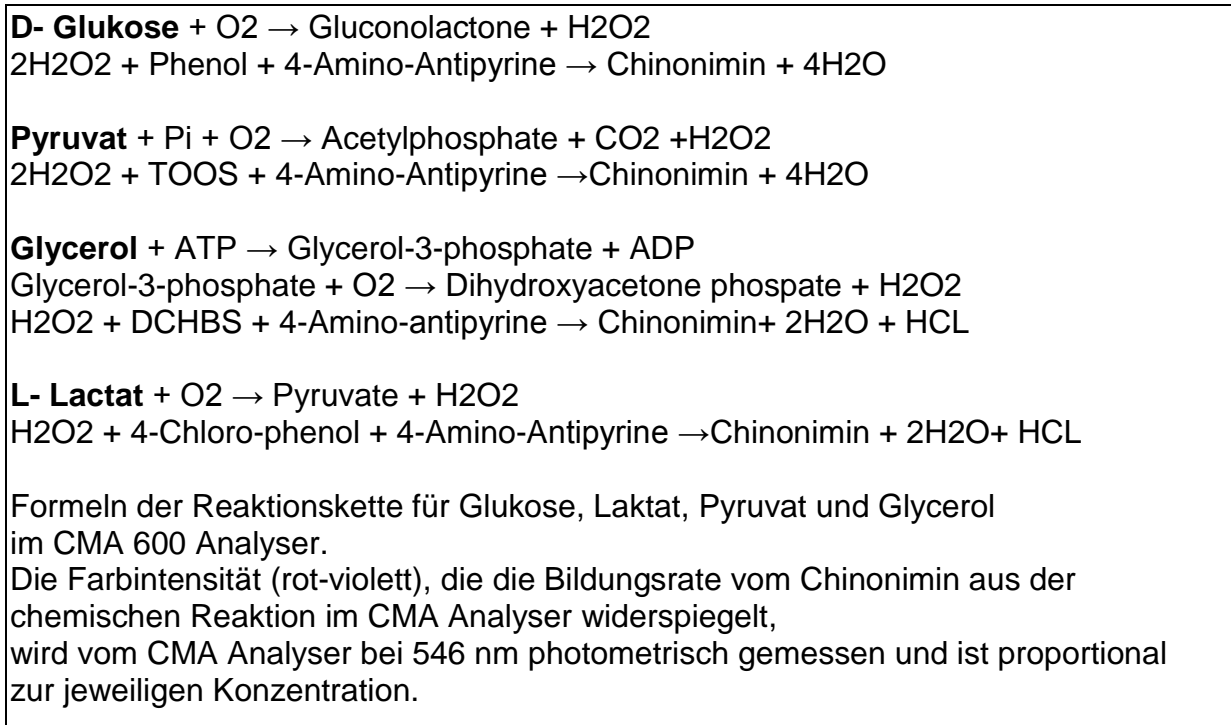
Die Daten wurden während der kalten Ischämiezeit für die 0,5./1./1,5./2./3./4./5./6./20. Stunde erhoben, während der Reperfusionszeit: 0,5 h nach Reperfusionsbeginn/ zur 2./4./6./8. Stunde.

Die Proben wurden entsprechend der Herstellerangaben bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die Analyse der gewonnenen Mikrodialysate (10µl) erfolgt mit Hilfe des CMA 600 Microdialysis Analyser (CMA/Microdialysis).

Der CMA Analyser 600 ermittelt durch ein enzymatisch- photometrisches Verfahren den Gehalt von Glukose, Laktat, Pyruvat und Glycerin aus geringen Mikrodialysatvolumina (ab 10µl).

Die Formeln der Reaktionskette sind hier aufgeführt:



aus Abrahamsson 2010[33]

### 3.5. Datenauswertung/ Statistik

Die Datensammlung und Datenaufarbeitung erfolgte in Microsoft Excel. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in Excel erstellt.

Die statistische Auswertung (Normalverteilung, Signifikanzen) und eine Erarbeitung von Mittelwerten und Standardabweichungen erfolgte mit dem Programm sigma stat Version 3.5 (2006) (www.systat.de, San José, Kalifornien, USA).

Die grafische Darstellung erfolgte mit sigma plot Version 10.0 (2006)

( [www.systat.de](http://www.systat.de), San José, Kalifornien, USA).

Um die Normalverteilung der metrischen Daten zu prüfen und signifikante Unterschiede zu erfassen, erfolgte eine One Way Analysis of Variance (ANOVA) - Analyse. Die Daten wurden in sigma stat automatisch mit dem Kolmogorov - Smirnov -Test auf Normalverteilung geprüft.

Um nach der Berechnung der Normalverteilung und Streuung/Standardabweichung (equal variance test) signifikante Unterschiede zu erfassen, wurde die Holm - Sidak - Methode angewendet. Signifikante Unterschiede definieren sich als ein  $p \leq 0,05$  im Gruppenvergleich.

Für nicht parametrische Daten (z.B. Makroskopie-Score) erfolgte die Ermittlung des Medians sowie der 25% und 75% Quartilen.

Hier erfolgte die Testung auf statistische Signifikanz mittels Anova on Ranks und dem Kruskal-Wallis one way Analysis of Variance on Ranks – Test.

Im Rahmen der Auswertung der Mikrodialysergebnisse erfolgte die Auswertung zum Teil mit dem Tukey-Test oder der Dunn´s Methode. Dies ist im Text der Mikrodialyse-Auswertung angegeben.

## 4. Ergebnisse

In jeder Gruppe wurden jeweils 7 Lebern untersucht.

### 4.1. Makroskopische Ergebnisse

Die makroskopische Beurteilung dient der ergänzenden Darstellung der Leberschädigung. Die erhobenen Zahlen sind Summen, wie unter 3.1. beschrieben.

Tab.5: Score der Leber in der Präperfusionsphase und Reperfusionenphase aller vier Gruppen, die Zahlen geben an: Median (25% /75%).

	Kontrolle	Spendergruppe	HTK- gruppe	Reperfusatgr.
Präperfusion	3 (3 /3)	3 (3 /3)	3 (3 /3)	3 (3 /3)
2h Reperf.	5,5 (5 /7,5)	3 (3 /4)	3 (3 /4,75)	5 (3 /7,75)
4h Reperf.	6 (5 /7)	*3 (3 /3)	3 (3 /4,75)	5 (3 /6,5)
6h Reperf.	7 (6 /7)	3,5 (3 /4)	3 (3 /4,75)	6 (3,25 /7,5)
7h Reperf.	7 (5,75 /7,25)	3,5 (3 /4)	3 (3 /4)	6 (4 /7,5)
8h Reperf.	9 (7,25 /9,25)	*3 (3 /4)	4 (3 /4,75)	5 (3,25 /8,75)

**Tab.5 semiquantitativer Makroskopie-Score in den einzelnen Gruppen zu bestimmten Zeiten des Versuchs, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle**

Die mit Iloprost behandelten Gruppen zeigen in der Reperfusionenphase niedrigere Scoreparameter als die Kontrollgruppe. Die Spendergruppe besitzt die niedrigsten Score - Werte während der Reperfusion.

In der vierten und achten Stunde zeigt die Spendergruppe signifikant niedrigere Scorewerte gegenüber der Kontrollgruppe.

## 4.2. Gewichtszunahme der Leber

Die Werte sind normal verteilt. In der Kontrollgruppe kommt es zur größten absoluten Gewichtszunahme im Vergleich aller Gruppen während der Reperfusion. Die mit Iloprost behandelten Gruppen zeigen eine geringere Gewichtszunahme vom Beginn der Reperfusion bis zur 8. Stunde.

Die geringste Gewichtszunahme findet sich in der Spendergruppe gefolgt von Reperfusat-, HTK- und Kontrollgruppe.

In der prozentualen Abweichung zur Baseline (Ausgangsgewicht) zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen der Spender- und Kontrollgruppe.

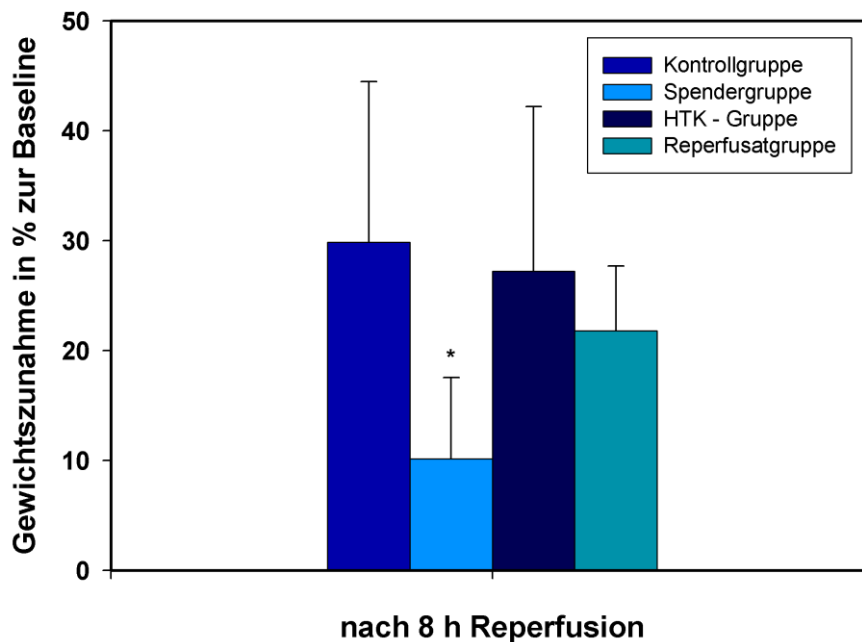


Abb.4 Gewichtszunahme in % zum Ausgangswert;

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

## 4.3. Laborchemische Ergebnisse

Die Ergebnisse beziehen sich auf 100g Lebergewebe. Es wurde die Präperfusionskonzentration des jeweiligen Parameters im Perfusat vom ermittelten Wert abgezogen.

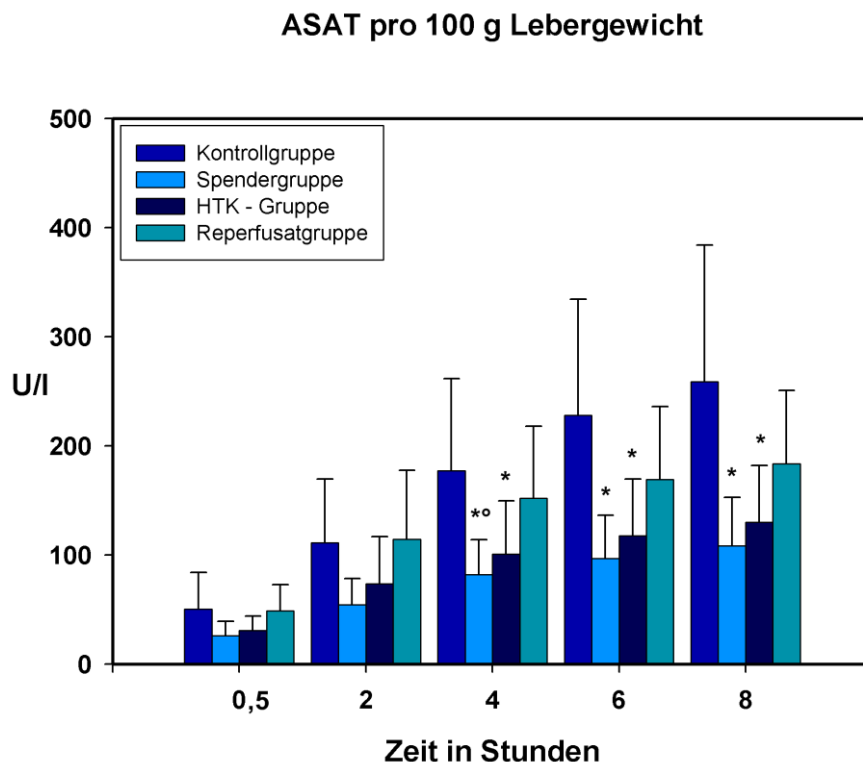
Endwert = (ermittelter Wert minus Präperfusion) / 100g Lebergewicht

#### 4.3.1. ASAT (Aspartat-Aminotransferase)

Alle Gruppen zeigten einen Anstieg der ASAT während der acht-stündigen Reperfusion. Die Ergebnisse sind alle normal verteilt.

Mit der Reperfusion der Leber (nach 20 Stunden kalter Ischämie) zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere ASAT - Werte in der Spendergruppe und in der HTK- Gruppe nach vier, sechs und acht Stunden Reperfusion. Die niedrigsten ASAT - Werte wies die Spendergruppe auf (nach der ersten halben Stunde  $26,15 \pm 13,00$  U/l, nach vier Stunden  $82,13 \pm 32,15$  U/l und nach acht Stunden  $108,66 \pm 44,05$  U/l). Die höchsten ASAT - Werte fanden sich zu allen Zeitpunkten in der Kontrollgruppe. Sie lagen nach der ersten halben Stunde Reperfusion bei  $50,64 \pm 33,31$  U/l, nach vier Stunden bei  $177,35 \pm 84,39$  U/l und nach acht Stunden bei  $258,90 \pm 125,15$  U/l.

Hohe ASAT - Werte fanden sich ebenso in der Reperfusatgruppe (nach der ersten halben Stunde lag die ASAT bei  $49,09 \pm 23,85$  U/l, nach vier Stunden  $151,91 \pm 66,26$  U/l, nach acht Stunden  $183,48 \pm 67,20$  U/l). Signifikant niedriger im Vergleich zur Reperfusatgruppe waren die ASAT - Werte der Spendergruppe in der vierten Reperfusionstunde.



**Abb. 5 ASAT pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionszeiten**

\*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe; °  $p < 0,05$  versus Reperfusatgruppe



### 4.3.2. ALAT (Alanin- Aminotransferase)

Die Werte sind normal verteilt. Die höchsten ALAT - Werte während der Reperfusion finden sich in der Kontrollgruppe mit  $1,69 \pm 0,64$  U/l zur ersten halben Stunde Reperfusion, mit  $4,58 \pm 2,51$  U/l nach vier Stunden und  $6,26 \pm 3,19$  U/l nach acht Stunden.

Die Gruppe mit den niedrigsten ALAT - Werten (nach der ersten halben Stunde  $1,05 \pm 0,52$  U/l, nach vier Stunden  $2,27 \pm 0,82$  U/l und nach acht Stunden  $2,89 \pm 1,19$  U/l Reperfusion) ist die Spendergruppe. In allen Gruppen zeigt sich ein Anstieg der ALAT - Werte. Die ALAT - Werte der HTK - Gruppe liegen zwischen denen der Spendergruppe und der Reperfusatgruppe. Die Reperfusatgruppe hat nach zweistündiger Reperfusion ALAT - Werte von  $3,96 \pm 2,30$  U/l, nach vier Stunden Werte von  $4,12 \pm 2,32$  U/l. Von den behandelten Gruppen weist sie zu allen Zeitpunkten die höchsten ALAT - Konzentrationen auf.

Die Ergebnisse der ALAT - Messung zeigten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

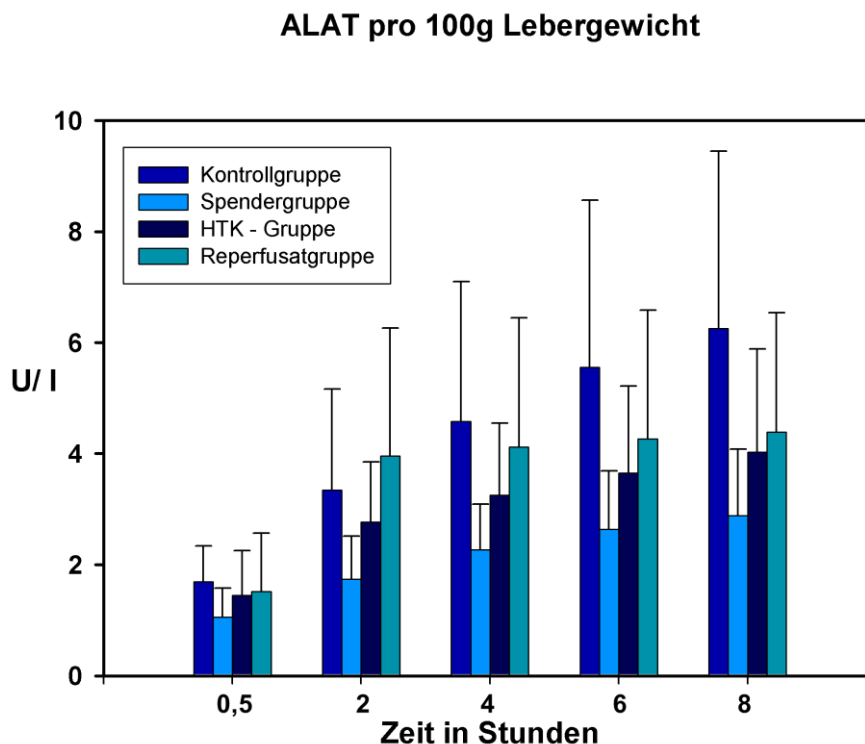


Abb. 6 ALAT pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionszeiten

### 4.3.3. GLDH (Glutamatdehydrogenase)

Nur nach zwei Stunden Reperfusion waren die GLDH - Werte in allen Gruppen normal verteilt. Die höchsten GLDH - Werte verzeichnete die HTK - Gruppe mit  $6,15 \pm 2,84$  U/l nach zwei Stunden Reperfusion, gefolgt von der Kontrollgruppe mit einer Konzentration von  $5,71 \pm 6,52$  U/l.

Die Spenderbehandlung wies die niedrigsten GLDH - Werte auf. Es zeigten sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

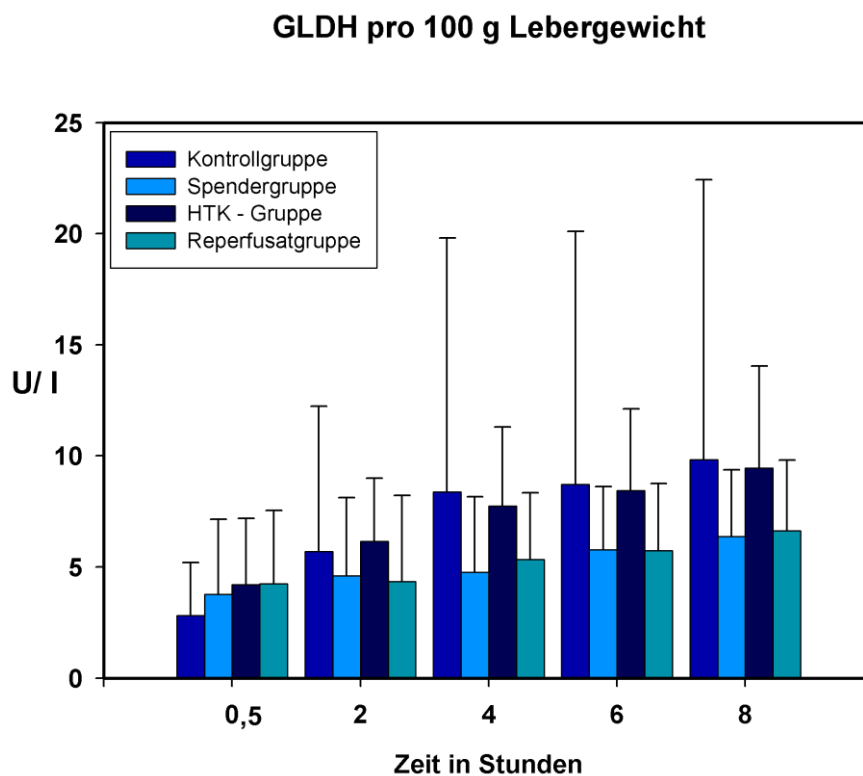


Abb. 7 GLDH pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionszeiten

### 4.3.4. LDH (Laktatdehydrogenase)

In allen Gruppen stieg die LDH nach Reperfusionsbeginn an. Die Ergebnisse waren alle normal verteilt. Die Kontrollgruppe wies nach vier, sechs und acht Stunden mit

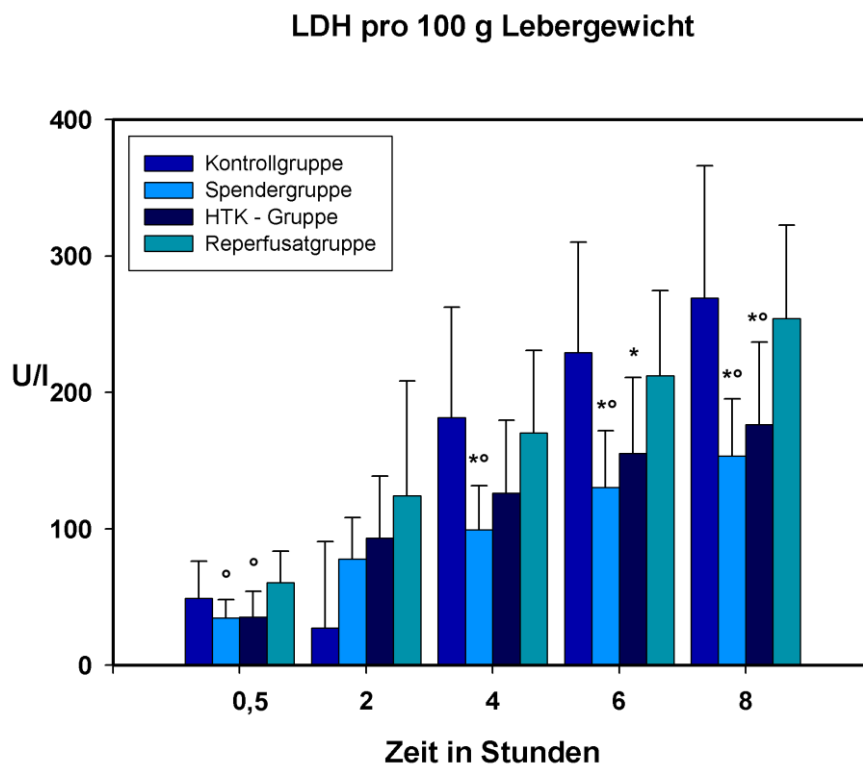
181,51 ±81,04 U/l, 229,14 ±85,35 U/l und 269,11 ±96,83 U/l die höchsten LDH - Werte aller Gruppen auf.

Nach der ersten halben Stunde war die LDH - Konzentration in der Reperfusatgruppe mit 60,42 ±23,10U/l am höchsten. Signifikant niedriger zur Reperfusatgruppe waren die Werte der Spendergruppe (34,6 ±13,28U/l) und HTK - Gruppe (35,20 ±18,98U/l) zur ersten halben Stunde.

Die Spendergruppe wies sehr geringe LDH - Werte während der Reperfusion auf. Sie lag mit ihren Werten signifikant unter den Werten der Reperfusat- und Kontrollgruppe nach der 4., 6., 8. Stunde Reperfusion.

Nach der ersten halben Stunde waren die Werte der HTK - Gruppe signifikant niedriger gegenüber der Reperfusatgruppe und nach der sechsten Stunde signifikant niedriger gegenüber der Kontrollgruppe.

Die HTK - Gruppe und Spendergruppe zeigten signifikant niedrigere LDH - Werte gegenüber der Reperfusatgruppe und Kontrollgruppe nach der achten Stunde Reperfusion.



**Abb. 8 LDH pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionzeiten**

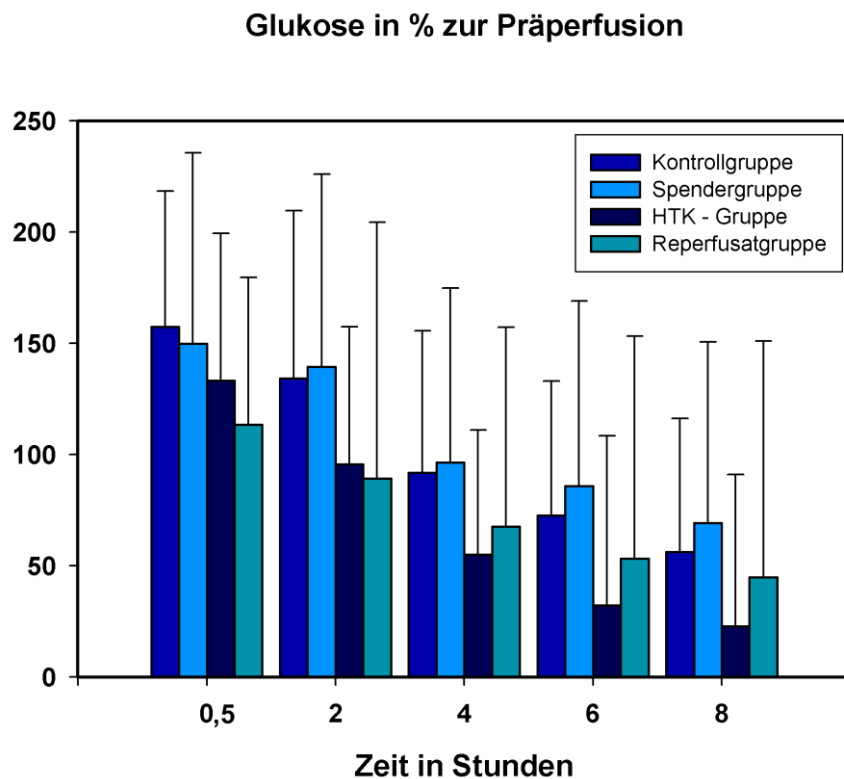
\* p<0,05 versus Kontrollgruppe; ° p<0,05 versus Reperfusatgruppe

#### 4.3.5. Glukose in % zur Präperfusion

Im Gruppenvergleich konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Alle Messwerte waren normalverteilt. Alle Gruppen zeigten einen kontinuierlichen Abfall der Glukose von der ersten halben Stunde der Reperfusion bis zur achten Stunde der Reperfusion.

In der Reperfusionphase wiesen die Spendergruppe und die Kontrollgruppe den prozentual höchsten Anteil der Glukose zur Präperfusion auf, wobei die HTK- Gruppe den geringsten Glukoseanteil aufwies.

Die Kontrollgruppe hat bis zur zweiten Stunde einen minimal höheren Glukoseanteil im Vergleich zur Spendergruppe.



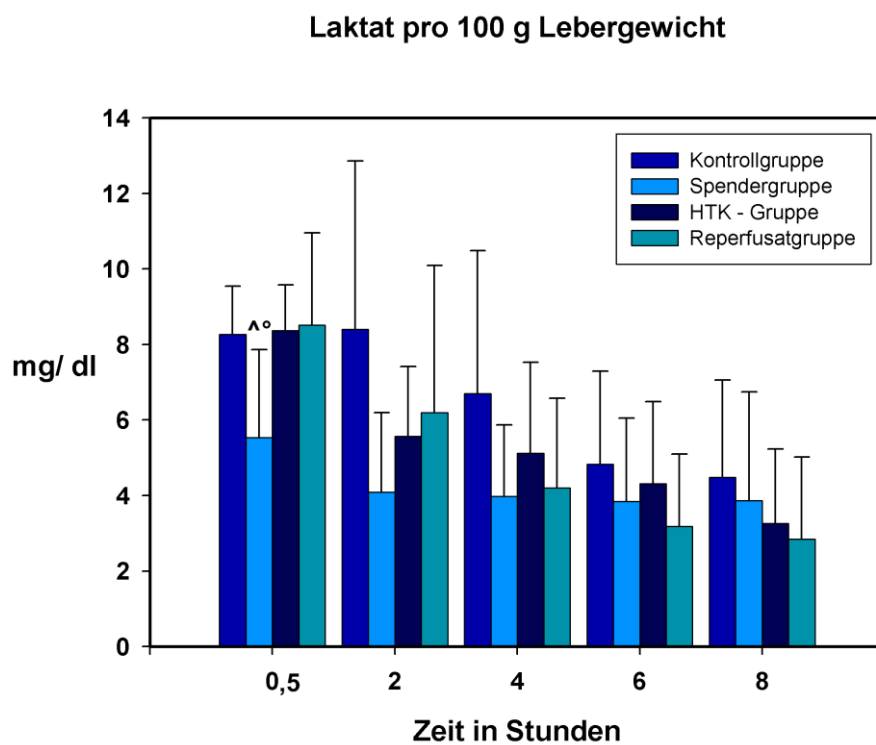
**Abb. 9 Glukose in % zur Präperfusion zu den einzelnen Reperfusionszeiten**

#### 4.3.6. Laktat in mg/dl

Die Ergebnisse zeigten alle eine Normalverteilung.

Die niedrigsten Laktatwerte nach der ersten halben Stunde Reperfusion wies die Spendergruppe auf ( $5,53 \pm 2,33$  mg/dl).

Die Spendergruppe hatte signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Reperfusatgruppe ( $8,51 \pm 2,45$  mg/dl) und zur HTK – Gruppe ( $8,37 \pm 1,2$  mg/dl) nach der ersten halben Stunde. Mit Beginn der Reperfusion sank das Laktat in allen Gruppen. In der Kontrollgruppe lagen die Anfangskonzentrationen bei  $8,26 \pm 1,28$  mg/dl und fielen auf  $4,48 \pm 2,57$  mg/dl. Dies waren nach acht Stunden die höchsten Werte im Vergleich zu den mit Iloprost behandelten Gruppen. In der Reperfusat- und HTK- Gruppe konnte bis zur achten Stunde ein deutlicher Laktatabfall verzeichnet werden. Die Laktat- Werte lagen zur 8. Stunde in der HTK- Gruppe ( $3,27 \pm 1,96$  mg/dl) und Reperfusatgruppe ( $2,84 \pm 2,18$  mg/dl) unter denen der Spendergruppe ( $3,86 \pm 2,88$  mg/dl).



**Abb. 8 Laktat pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionszeiten**  
<sup>^</sup>  $p < 0,05$  versus HTK- Gruppe; <sup>°</sup>  $p < 0,05$  versus Reperfusatgruppe

#### 4.3.7. Elektrolyte

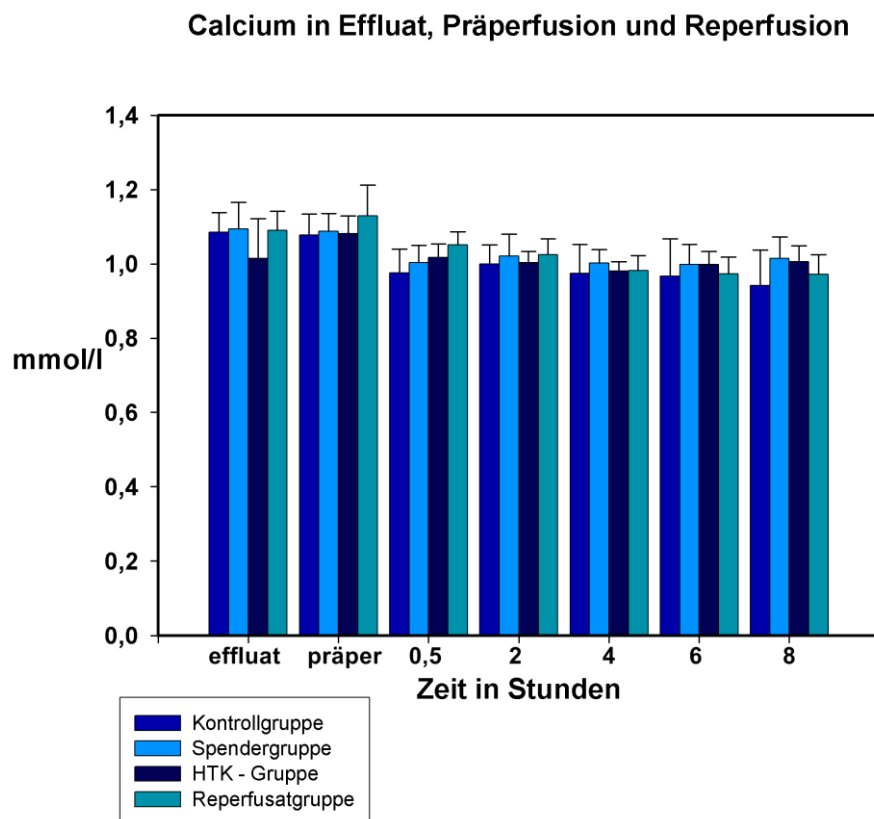
##### Calcium (Ca<sup>2+</sup>) in mmol/l

Die Ausgangskonzentration des Calciums im Perfusat vor der Reperfusion lag immer über 1mmol/l. Die Effluatwerte liegen alle über 1 mmol/l. Normalverteilt sind die

Calciumwerte aller Gruppen zur halben, zweiten und sechsten Stunde. Es sind die höchsten Werte in jeder einzelnen Gruppe. Die  $\text{Ca}^{2+}$  - Konzentration nimmt in allen Gruppen im Vergleich zu den Präperfusionswerten ab. Im Gruppenvergleich traten keine Signifikanzen auf. Die Kontrollgruppe wies zur halben, zweiten, sechsten und achten Stunde die niedrigsten  $\text{Ca}^{2+}$  - Werte auf.

Die Calciumwerte der Spendergruppe sind über acht Stunden annähernd gleich. Die Calciumwerte der HTK- Gruppe zeigen eine minimal schwankende Tendenz in den acht Stunden Reperfusion. Sie differieren nicht stark voneinander.

In der Reperfusatgruppe ist der minimale Abfall des Calciums etwas deutlicher erkennbar. Im Gesamtbild ordnet er sich in den Gruppen ein und zeigt keine großen Differenzen.



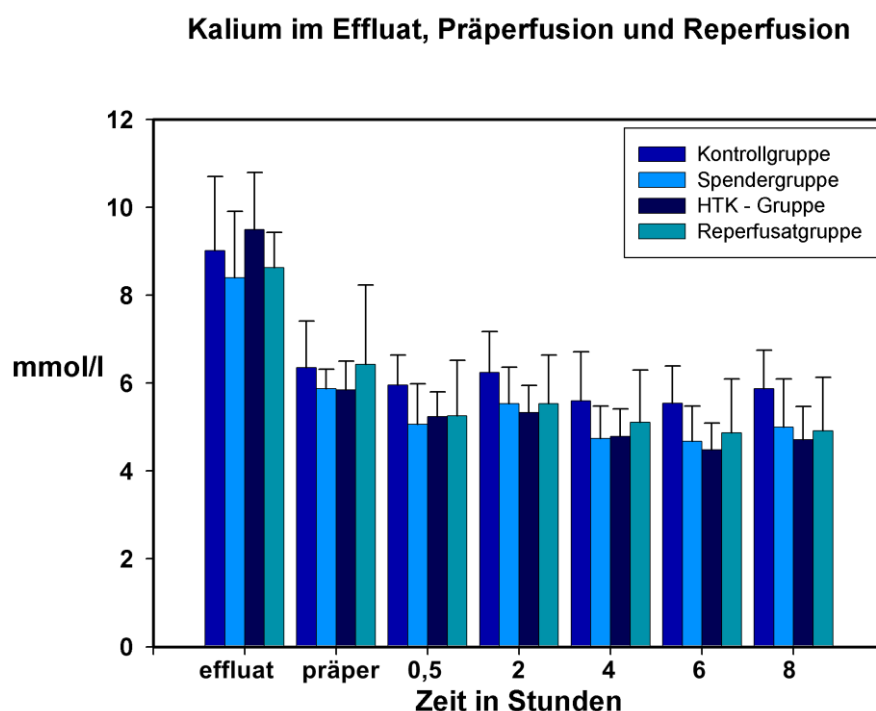
**Abb. 9 Calcium pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionszeiten**

### Kalium in mmol/l

Normalverteilt waren die Kaliumwerte aller Gruppen zur 4., 6., 8. Stunde. Sehr hohe Kalium-Werte fanden sich bei allen Gruppen im Effluat (Ausspülen des Kaliums durch das Flushen). Die höchsten Kaliumwerte lagen hier in der HTK - Gruppe (9,5

$\pm 1,3$  mmol/l) und Kontrollgruppe ( $9,0 \pm 1,69$  mmol/l). Die Spendergruppe hatte im Mittel ein Kaliumwert von  $8,4 \pm 1,51$  mmol/l; die Reperfusatgruppe von  $8,63 \pm 0,81$  mmol/l. Die Kontrollgruppe zeigte zu jeder Stunde der Reperfusion die höchsten Kaliumwerte.

In allen Gruppen waren während der Reperfusionzeit minimale Schwankungen der Kaliumwerte zu beobachten. Es traten im Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.



**Abb. 10 Kalium pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionzeiten**

## Natrium

Insgesamt liegen die Absolutwerte in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten zwischen 120 mmol/l und 140 mmol/l (Norm beim Schwein: 140- 160 mmol/l, Kraft 2000).

In allen Gruppen findet sich ein leichter geringer Anstieg des Natriums (mmol/l) innerhalb dieser Werte.

Die Absolutwerte zeigen in allen Gruppen kaum Unterschiede zueinander. Es treten keine signifikanten Unterschiede auf.

### Natrium im Effluat, Präperfusion und Reperfusion

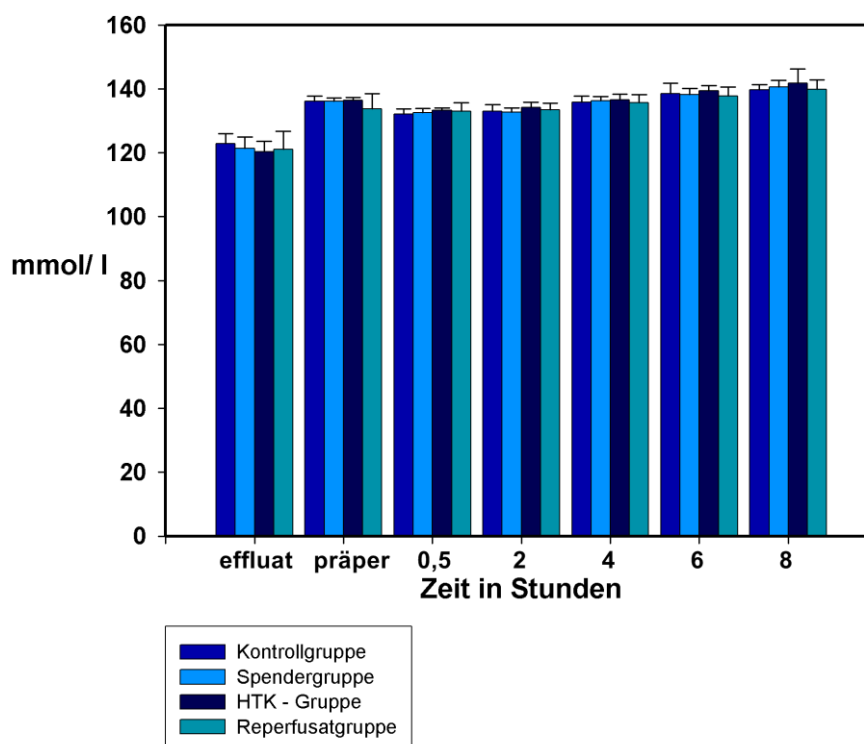


Abb. 11 Natrium pro 100g Lebergewicht zu den einzelnen Reperfusionszeiten

#### 4.3.8. Mediatoren

##### 4.3.8.1. cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat)

Die Werte sind zur ersten halben und vierten Stunde normalverteilt.

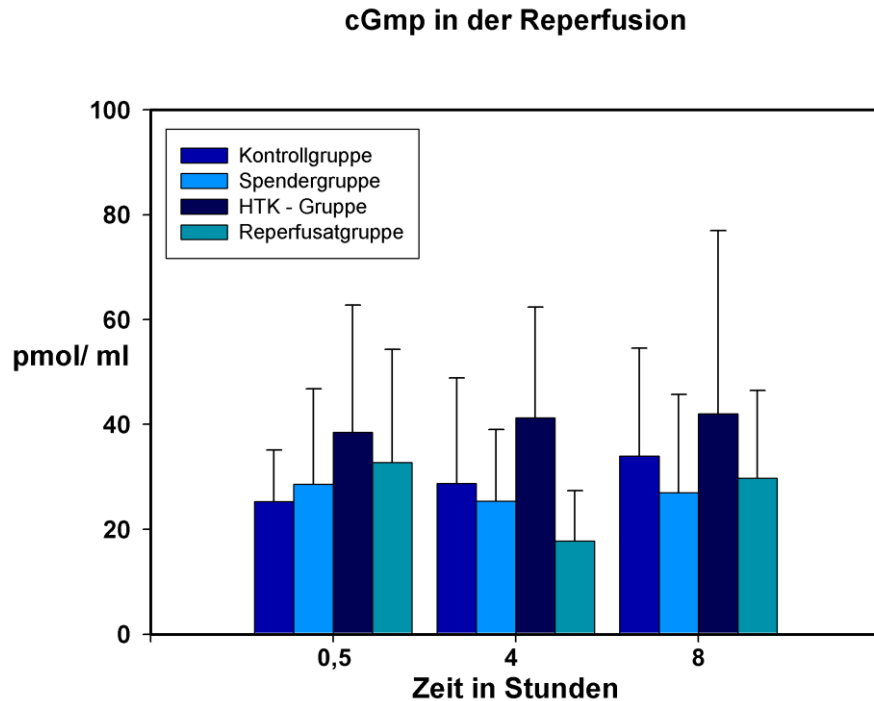
In der Kontrollgruppe ist ein leichter Anstieg der cGMP- Werte in den ersten vier Stunden erkennbar.

Die Iloprost behandelten Gruppen zeigen nach der ersten halben Stunde höhere cGMP- Konzentrationen als die Kontrollgruppe. Die höchsten und annähernd gleich bleibenden Konzentrationen erkennt man in der HTK - Gruppe.

Fast gleich bleibt die cGMP- Konzentration ebenso in der Spendergruppe. Die Reperfusatgruppe zeigt bei hohen Anfangswerten einen Abfall der cGMP- Werte bis zur vierten Stunde.



Insgesamt traten zwischen den Gruppen zu allen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede auf.



**Abb. 12 cGMP zu den einzelnen Reperfusionzeiten**

#### **4.3.8.2. MPO ( Myeloperoxidase )**

Die postoperativen und acht Stundenwerte sind normal verteilt. Die MPO-Konzentration steigt in allen Gruppen an. Die höchste MPO- Konzentration zeigt sich nach acht- stündiger Reperfusion in der Kontrollgruppe. Es traten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Die geringste MPO- Konzentration findet sich postoperativ in der HTK – Gruppe. In der Reperfusatgruppe zeigt sich nach acht Stunde Reperfusion die geringste MPO – Konzentration.

## MPO postoperativ und in Reperfusion

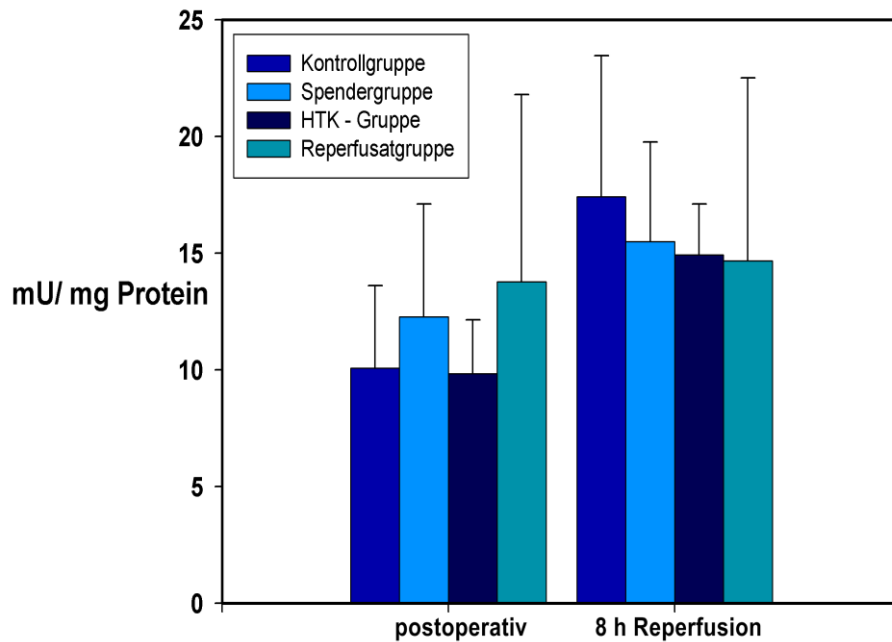


Abb. 13 MPO postoperativ und nach acht Stunden Reperfusion

### 4.4. Mikrodialyseergebnisse der Kontroll-, Spender- und HTK- Gruppe n (je Gruppe)= 5

Im Text werden die Werte, bei denen statistisch signifikante Unterschiede gefunden wurden als Mittelwert und +/- Standardabweichung beschrieben.

Der Übersicht halber wurde auf eine ausführliche Auflistung aller gemessenen Werte verzichtet, diese können den jeweiligen Grafen bzw. einer dazugehörigen Tabelle entnommen werden.

#### 4.4.1. Glukosekonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen

##### Die Glukosekonzentration in den ersten sechs Stunden der kalten Ischämie

Normalverteilt sind die Werte zu allen Stunden. In allen Gruppen tritt mit der kalten Ischämie bis zur dritten Stunde ein kontinuierlicher Anstieg der Glukosekonzentration im Gewebe auf.

Innerhalb der Kontrollgruppe liegen die Ergebnisse der ersten halben Stunde ( $9,86 \pm 9,79\text{mM}$ ) signifikant unter den Werten der zweiten bis sechsten Stunde.

(2. Stunde:  $29,58 \pm 6,15 \text{ mM}$ ; 3. Stunde:  $34,85 \pm 8,64\text{mM}$ , 4. Stunde:  $32,08 \pm 8,87\text{mM}$ , 5. Stunde:  $31,25 \pm 9,35\text{mM}$ ;  $29,97 \pm 9,18\text{mM}$ ; 6. Stunde:  $29,96 \pm 9,18\text{mM}$ ) .

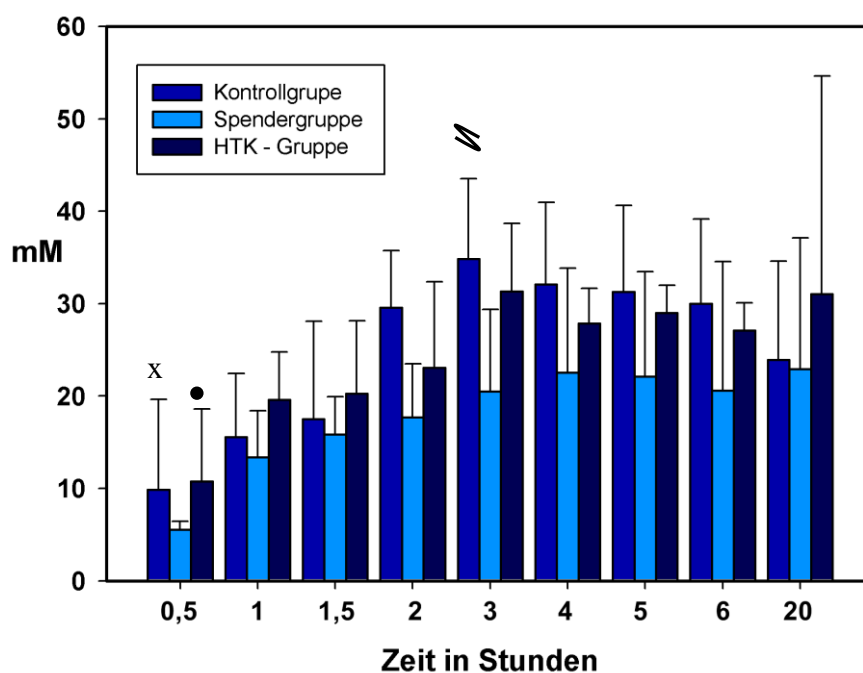
Die Werte der dritten Stunde (3. Stunde:  $34,85 \pm 8,64\text{mM}$ ) sind signifikant höher im Vergleich zur ersten Stunde ( $15,54 \pm 6,87\text{mM}$ ) innerhalb der Kontrollgruppe.

In der HTK- Gruppe liegen die Ergebnisse der ersten halben Stunde ( $10,75 \pm 7,81 \text{ mM}$ ) signifikant unter den Werten der dritten bis sechsten Stunde (3.Stunde:  $31,30 \pm 7,34\text{mM}$ ; 4.Stunde  $27,84 \pm 3,81\text{mM}$ ; 5. Stunde  $28,96 \pm 2,99\text{mM}$ ; 6. Stunde:  $27,11 \pm 2,99\text{mM}$ ). Im Gruppenvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

In der vierten Stunde steigt die Glukosekonzentration nur in der Spendergruppe, die zu allen Zeiten die geringsten Glukosewerte aufweist, minimal an.

Alle anderen Gruppen zeigen einen leichten Glukoseabfall. Die Spendergruppe zeigt weiterhin einen minimalen Abfall bis zur sechsten Stunde.

#### Glukose in kalter Ischämiezeit



**Abb. 14 Mikrodialyse Glukose während der kalten Ischämie**

•  $p < 0,05$  zur 3., 4., 5., 6. Stunde in der HTK- Gruppe

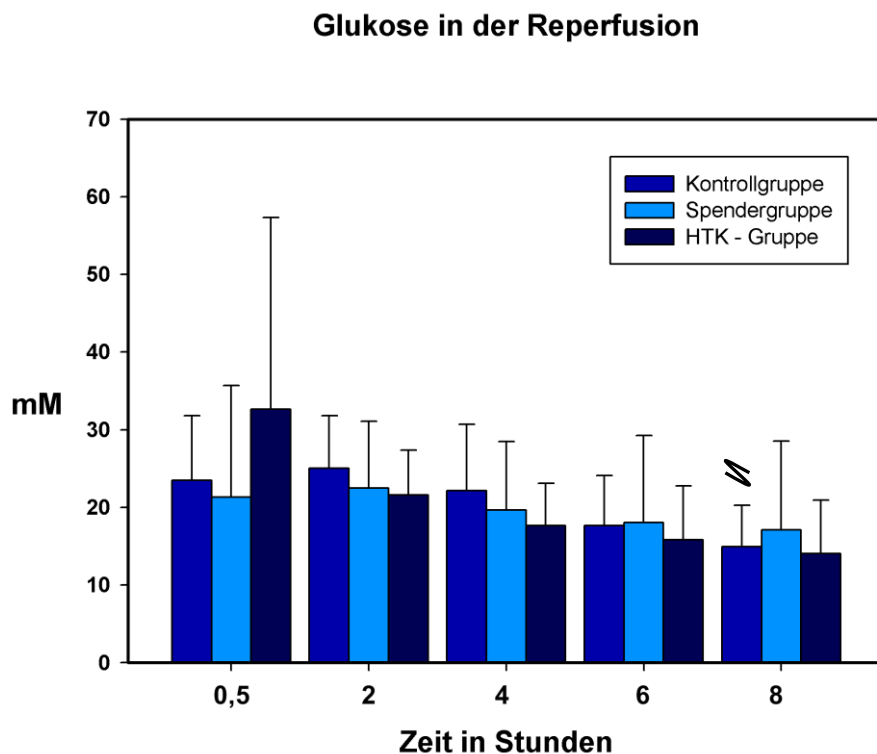
//  $p < 0,05$  zur 1. Stunde in der Kontrollgruppe während der kalten Ischämie und zur 8. Stunde Reperfusion

x  $p < 0,05$  zur 2.,3.,4.,5.,6. Stunde in der Kontrollgruppe

## Die Glukosekonzentration während der acht Stunden Reperfusion

Die Werte sind für die 0,5.; 2.; 4.; 6. und 8. Stunde dargestellt. Die per Mikrodialyse erhobenen Glukose - Werte sind zu allen Zeitpunkten normal verteilt. In den acht Stunden Reperfusion zeigt sich ab der zweiten Stunde in allen Gruppen ein Glukoseabfall. Die über die Mikrodialyse erhobenen Glukosewerte zeigen einen ähnlichen Abfall wie die im Perfusat gemessenen Glukosewerte.

Die fallenden Glukosewerte im Perfusat spiegeln den Glukoseabfall im Gewebe wider. Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 15 Mikrodialyse: Glukose zu den einzelnen Reperfusionzeiten**

≡  $p < 0,05$  zur dritten Stunde der kalten Ischämie in der Kontrollgruppe

In der Übersicht bestehen zwischen den Ischämie- und Reperfusionsergebnissen Unterschiede. Die Werte steigen während der kalten Ischämie an und fallen während der Reperfusion wieder ab. Die Daten sind normal verteilt.

In der Kontrollgruppe sind die Ergebnisse der dritten Stunde ( $34,85 \pm 8,64 \text{mM}$ ) der kalten Ischämie signifikant höher zur achten Stunde Reperfusion ( $14,95 \pm 5,32 \text{mM}$ ).

Innerhalb der Spender- und HTK- Gruppe treten zwischen den Ischämie- und Reperfusionsergebnissen keine signifikanten Unterschiede auf.

#### 4.4.2. Glycerinkonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen

##### Die Glycerinkonzentration in den ersten sechs Stunden der kalten Ischämie

Normalverteilt sind die Werte zu den dargestellten Zeiten der kalten Ischämie mit Ausnahme der Werte nach 20h kalter Ischämie in der Spender- und Kontrollgruppe. Die Werte nach 20 Stunden kalter Ischämie liegen in allen Gruppen signifikant über den Werten der ersten halben Stunde.

Angaben in $\mu\text{M}$	Kontrollgruppe	Spendergruppe	HTK - Gruppe
<b>0,5h ischämie</b>	483,41 +/- 456,45	317,78 +/- 72,36	365,73 +/-230,42
<b>20 h ischämie</b>	1966,14 +/- 787,91	1800,14 +/- 600,66	2101,63 +/-796,1
	<i>Dunn`s method</i>	<i>Dunn´s method</i>	<i>Dunn´s method</i>

**Tab. 6: Signifikante Glycerinwerte während der kalten Ischämiezeit**

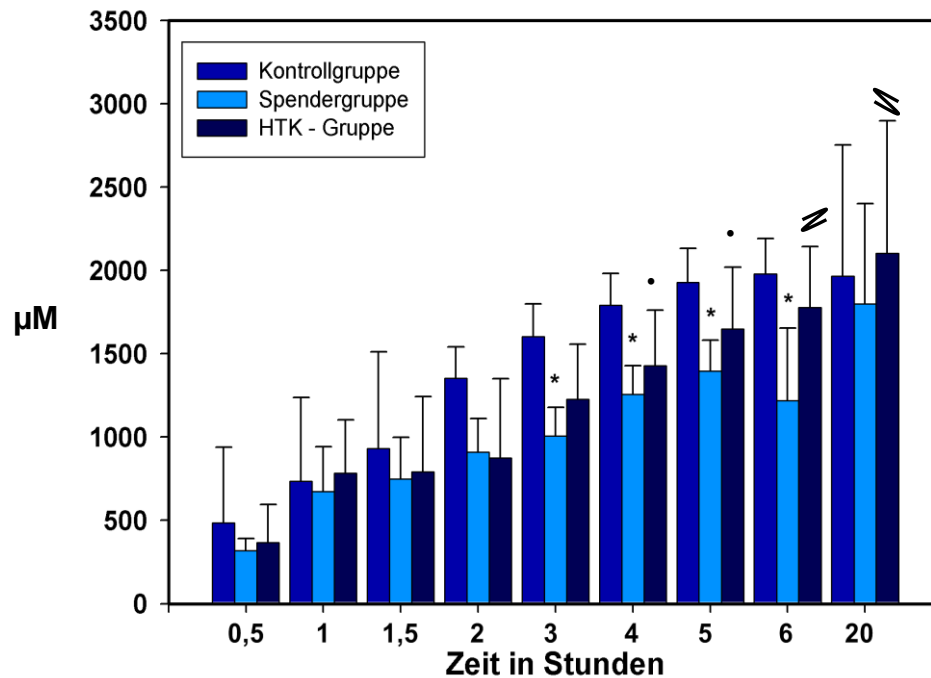
Es ist ein deutlicher Anstieg der Glycerinkonzentration in allen Gruppen mit der Zeit erkennbar. Die Konzentrationen der Kontrollgruppe liegen zu allen Zeitpunkten am höchsten. Nach der dritten, vierten, fünften und sechsten Stunde sind die Werte (siehe Tabelle 7) der Spendergruppe signifikant niedriger zur Kontrollgruppe.

Wertet man die Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe aus, so ergibt sich keine Normalverteilung. Mit der Dunn´s Methode ergeben sich nach der ersten halben Stunde signifikant niedrigere Ergebnisse zur fünften und sechsten Stunde. Innerhalb der HTK- Gruppe sind die Daten normalverteilt, hier liegen die Ergebnisse nach 20 Stunden signifikant über den Werten der halben; ersten; eineinhalben; zwei Stunden. Die Werte der sechsten Stunde sind signifikant höher zur halben, ersten und eineinhalben Stunde. Die Ergebnisse nach vier und fünf Stunden liegen signifikant über denen der ersten halben Stunde.

Innerhalb der Spendergruppe zeigt sich bei der vergleichenden Betrachtung keine Normalverteilung. Nach der Dunn´s Methode liegen die Ergebnisse der fünften und 20. Stunde signifikant über den Werten der ersten halben Stunde.

Von den behandelten Gruppen weist die HTK - Gruppe die höchsten Glycerinkonzentrationen auf.

### Glycerin in kalter Ischämiezeit



**Abb. 16 Mikrodialyse Glycerin während der kalten Ischämie**

\*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe

•  $p < 0,05$  zur 0,5. Stunde in der HTK-Gruppe

//  $p < 0,05$  zur 0,5.; 1.; 1,5. Stunde in der HTK-Gruppe

≡  $p < 0,05$  zur 0,5.; 1.; 1,5.; 2. Stunde in der HTK-Gruppe

	Kontrollgruppe	Spendergruppe	HTK - Gruppe
<b>0,5h</b>	483,41 +/- 456,45	317,78 +/- 72,36	365,73 +/- 230,42
<b>1h</b>	735,44 +/- 501,65	673,67 +/- 269,07	783,34 +/- 319,02
<b>1,5h</b>	931,49 +/- 579,92	748,47 +/- 249,10	790,20 +/- 452,55
<b>2h</b>	1352,12 +/- 189,49	909,46 +/- 201,53	873,72 +/- 476,93
<b>3h</b>	1602,77 ± 197	1006,91 ± 172,4	1227,75 +/- 328,20
<b>4h</b>	1790,99 ± 192,59	1255,95 ± 172,47	1427,40 +/- 334,98
<b>5h</b>	1927,79 ± 204,22	1396,19 ± 185,23	1648,58 +/- 371,30
<b>6h</b>	1978,01 ± 214,21	1217,22 ± 436,62	1777,88 +/- 366,11
<b>20h</b>	1966,14 +/- 787,91	1800,14 +/- 600,66	2101,63 +/- 796,1

Angaben in µM

**Tab. 7: Glycerinwerte während der kalten Ischämiezeit**

## Die Glycerinkonzentration während der acht Stunden Reperfusion

Normalverteilt sind die Werte zur halben, zweiten und achten Stunde.

Die Konzentrationen in der Kontrollgruppe liegen zu allen Zeitpunkten am höchsten.

Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu verzeichnen.

Die Werte der achten Stunde liegen in der Kontrollgruppe bei  $31,49 \pm 10,05 \text{ mM}$ ; in der Spendergruppe bei  $31,31 \pm 10,4 \text{ mM}$  und in der HTK- Gruppe bei  $29,28 \pm 12,11 \text{ mM}$ .

Nach der Dunn's Methode liegen die nicht normal verteilten Daten innerhalb der Kontrollgruppe der ersten halben Stunde signifikant über den Werten der sechsten Stunde.

Innerhalb der HTK- Gruppe liegen die Ergebnisse der ersten halben Stunde signifikant über den Werten der vierten und sechsten Stunde nach der Dunn's Methode.

### Glycerin in der Reperfusion

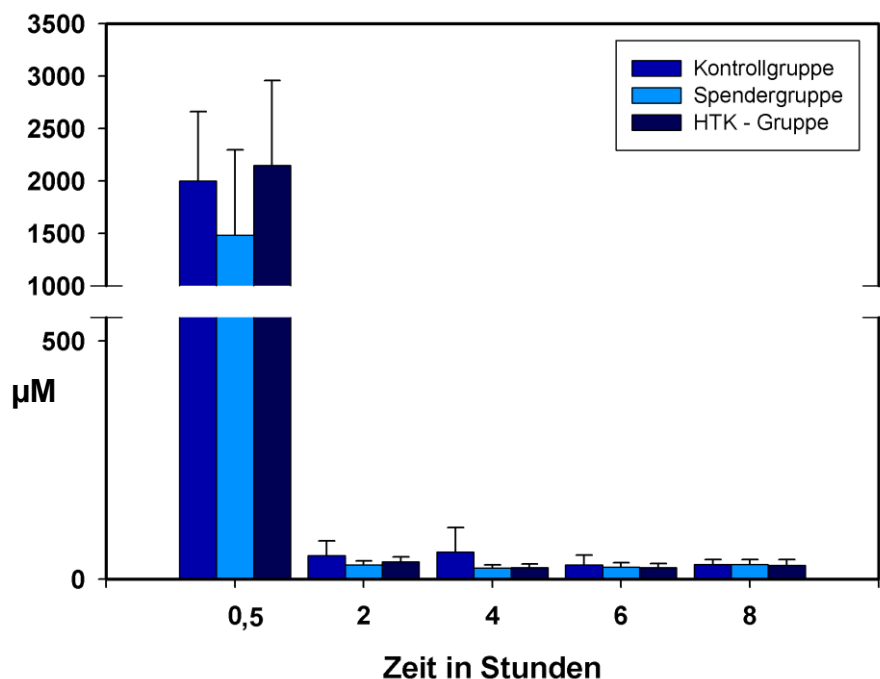


Abb. 17 Mikrodialyse Glycerin zu den einzelnen Reperfusionzeiten

	<b>Kontrollgruppe</b>	<b>Spendergruppe</b>	<b>HTK- gruppe</b>
<b>0,5h</b>	1999,08 +/-661,96	1485,32 +/-812,64	2147,04 +/-810,34
<b>2h</b>	49,76 +/-30,89	30,08 +/-8,34	36,85 +/-9,96
<b>4h</b>	56,87 +/-51,35	23,07 +/-6,79	24,03 +/-8,15
<b>6h</b>	30,16 +/-20,18	25,27 +/-9,10	24,95 +/-7,75
<b>8h</b>	31,49 +/-10,05	31,31 +/-10,40	29,28 +/-12,11

Angaben in  $\mu\text{M}$

**Tab. 8: Glycerinwerte während der Reperfusionzeit**

Vergleicht man die Ergebnisse der Ischämie mit denen der Reperfusion in einer Gruppe, so ergeben sich innerhalb der einzelnen Gruppen keine Normalverteilungen jedoch nach der Dunn's Methode signifikante Unterschiede.

Innerhalb der Kontrollgruppe liegen die Werte der fünften und sechsten Ischämiestunde signifikant über denen der sechsten und achten Reperfusionstunde. Die Ergebnisse nach 20 Stunden kalter Ischämie liegen signifikant über denen der sechsten und achten Reperfusionstunde.

In der Spendergruppe sind die Werte nach 20 Stunden kalter Ischämie signifikant höher im Vergleich zur vierten Stunde der Reperfusion.

In der HTK- Gruppe liegen die Werte der sechsten und 20. Stunde kalter Ischämie signifikant über denen der vierten und sechsten Stunde Reperfusion. Die Daten nach fünf Stunden kalter Ischämie liegen über denen nach vier Stunden Reperfusion.

#### **4.4.3. Laktatkonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen**

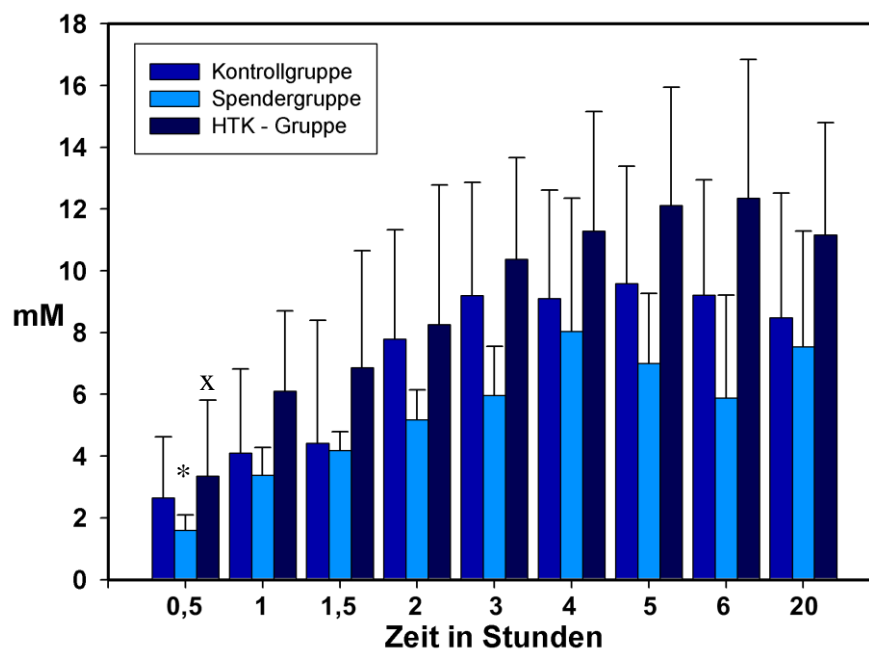
##### Die Laktatkonzentration in den ersten sechs Stunden der kalten Ischämie

Normalverteilt sind die Werte zu allen Stunden. Es ist ein deutlicher Anstieg der Laktatkonzentration in allen Gruppen mit der Zeit erkennbar sowie ein leichter Laktatabfall bis zur 20. Stunde. Die Laktatkonzentration ist zu allen Zeiten in der HTK- Gruppe am höchsten und erreicht in der sechsten Stunde deutlich höhere Werte ( $12,35 \pm 4,49\text{mM}$ ) im Vergleich zur Spendergruppe ( $5,88 \pm 3,33\text{mM}$ ). Innerhalb der HTK- Gruppe liegen die normal verteilten Ergebnisse der ersten halben Stunde



(3,34 +/-2,47mM) signifikant unter den Werten der fünften (12,12 +/-3,83 mM) und sechsten (12,35 +/-4,49mM) Stunde nach der Holm- Sidak Methode. Die Spendergruppe zeigt die geringsten Laktatkonzentrationen zu allen Zeiten. In der vierten Stunde hat die Spendergruppe ihr Maximum der Laktatkonzentration (8,04 ±4,31mM) erreicht. Die Auswertung der Daten innerhalb der Spendergruppe zeigt keine Normalverteilung. Die Ergebnisse der vierten (8,04 ±4,31mM) und fünften (6,99 +/-2,27) Stunde sind signifikant höher im Vergleich zur ersten halben Stunde nach der Dunn´s Methode (1,59 +/-0,51mM). Die Laktatkonzentration fällt bis zur sechsten Stunde wieder leicht ab. Die Kontrollgruppe liegt mit ihren Werten über denen der Spendergruppe. Insgesamt steigen die Laktatwerte nicht über 13 mM. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

### Laktat in kalter Ischämiezeit



**Abb. 18 Mikrodialyse Laktat während der kalten Ischämie**

x p<0,05 versus fünfter und sechster Stunde in der HTK- Gruppe

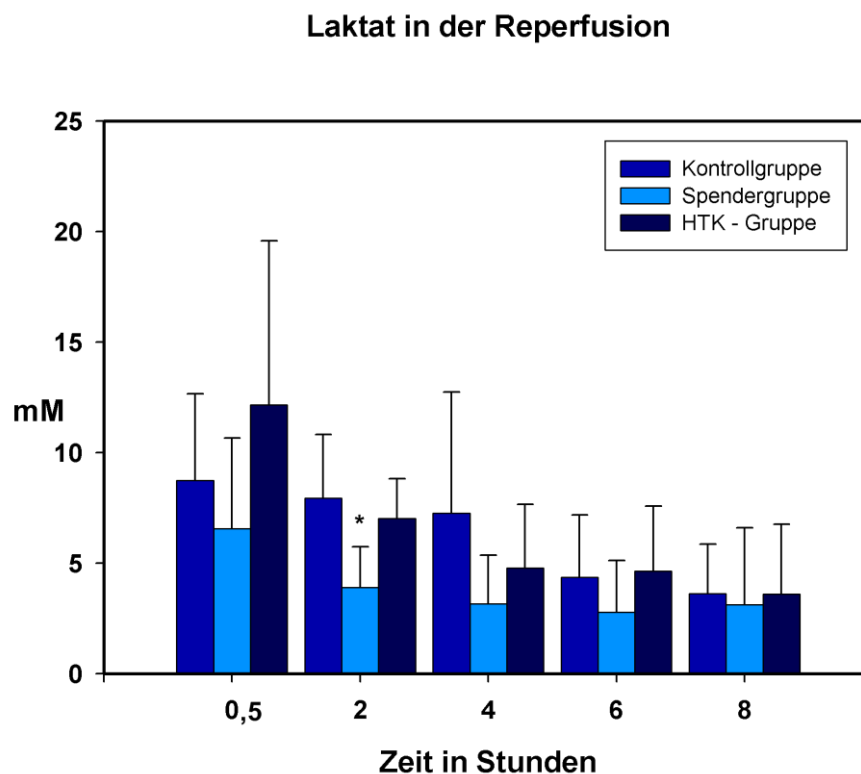
\* signifikant niedriger versus vierter und fünfter Stunde nach der Dunn´s Methode in der Spendergruppe

## Die Laktatkonzentration während der acht Stunden Reperfusion

Insgesamt fallen die Laktatwerte während der Reperfusion in allen Gruppen im Vergleich zur kalten Ischämie ab. Normalverteilt sind die Werte zu allen dargestellten Messzeitpunkten.

Eine signifikant niedrigere Laktatkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $7,94 \pm 2,88\text{mM}$ ) findet sich in der Spendergruppe ( $3,91 \pm 1,82\text{mM}$ ) zur zweiten Stunde. Die Kontrollgruppe behält ab der zweiten Stunde die höchsten Laktatkonzentrationen.

Die Konzentrationen in der HTK- Gruppe sind im Vergleich aller Gruppen zur ersten halben Stunde am höchsten ( $12,17 \pm 7,41\text{mM}$ ) bei hohen Laktatkonzentrationen während der kalten Ischämie. In der HTK- Gruppe fällt die Laktatkonzentration während der Reperfusion von  $12,17\text{mM}$  auf  $3,6\text{mM}$  ab. In der Spendergruppe zeigen sich bis zur achten Stunde die geringsten Laktatkonzentrationen.



**Abb. 19 Mikrodialyse Laktat zu den einzelnen Reperfusionszeiten**

\*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe

Innerhalb der einzelnen Gruppen treten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der kalten Ischämie und den Ergebnissen der Reperfusion auf.

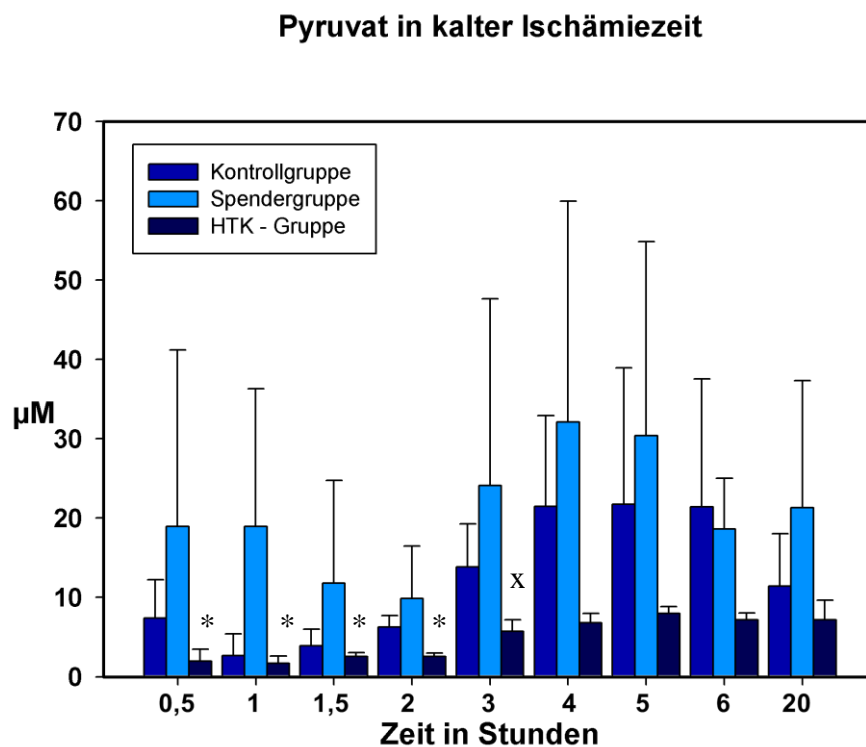
#### 4.4.4. Pyruvatkonzentration im Mikrodialysat während der kalten Ischämie und Reperfusion in den drei untersuchten Gruppen

##### Die Pyruvatkonzentration in den ersten sechs Stunden der kalten Ischämie

Die Werte sind zur ersten halben Stunde normalverteilt.

Die höchsten Konzentrationen finden sich in der Spendergruppe. Alle Gruppen zeigen einen schwankenden Verlauf der Pyruvatwerte über die Stunden der kalten Ischämie. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich.

Innerhalb der HTK- Gruppe liegen die Ergebnisse der halben, ersten, eineinhalb, zweiten Stunde signifikant unter den Werten der vierten, fünften, sechsten und 20. Stunde der kalten Ischämie; die Werte der dritten Stunde liegen signifikant über den Ergebnissen der halben, ersten und zweiten Stunde nach der Holm-Sidak-Methode.



**Abb. 20 Mikrodialyse Pyruvat während der kalten Ischämie**

\* signifikant zur vierten, fünften, sechsten, 20. Stunde innerhalb der HTK gruppe

x signifikant versus halben, ersten und zweiten Stunde innerhalb der HTK gruppe

Stunde	HTK- Gruppe	Stunde	HTK- Gruppe
0,5h	1,96 +/-1,49	4h	6,82 +/-1,17
1h	4,70 +/-0,92	5h	7,99 +/-0,85
1,5h	2,55 +/-0,51	6h	7,14 +/-0,87
2h	2,54 +/-0,46	20h	7,19 +/-2,44
3h	5,75 +/-1,43		

Anagben in  $\mu\text{M}$

**Tab. 9: signifikante Pyruvatwerte der HTK – Gruppe während der kalten Ischämiezeit**

### Die Pyruvatkonzentration während der acht Stunden Reperfusion

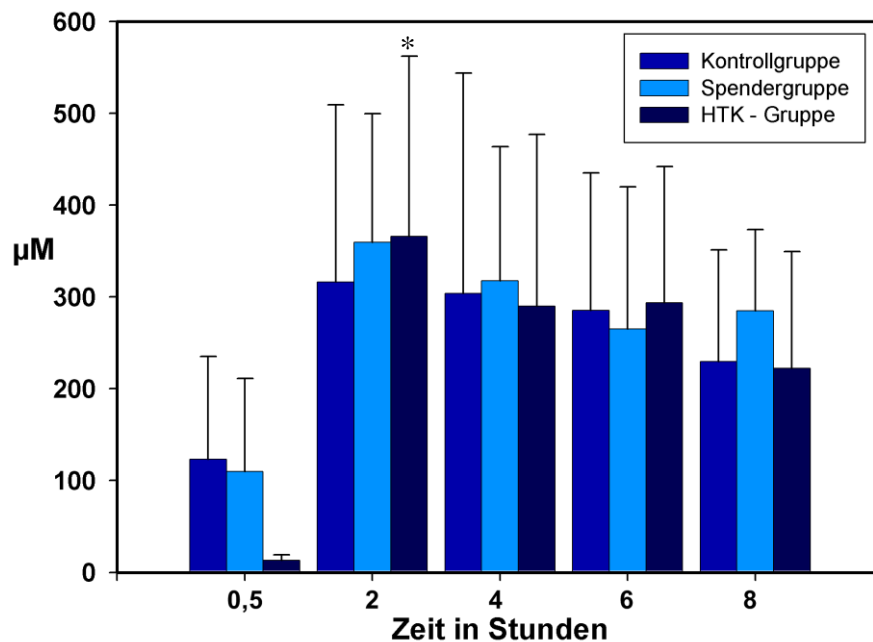
Normal verteilt sind die Werte zu allen Stunden der Reperfusion.

In den ersten zwei Stunden steigt die Pyruvatkonzentration in allen Gruppen an. Danach fällt sie wieder ab.

Zwischen den einzelnen Gruppen traten keine signifikanten Unterschiede auf. Die Pyruvatkonzentrationen der Iloprost behandelten Gruppen liegen in den ersten zwei Stunden über denen der Kontrollgruppe, ohne signifikanten Unterschied. In der Spender- und HTK- Gruppe fällt das Pyruvat nach der zweiten Stunde bis zur achten Stunde ab. Nach acht Stunden Reperfusion hat die Spendergruppe die höchsten Pyruvatwerte ( $285,12 \pm 88,23 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $229,59 \pm 121,82 \mu\text{M}$ ) und HTK-Gruppe ( $222,26 \pm 127,25 \mu\text{M}$ ).

In der HTK- Gruppe liegen statistisch nach der Dunn's Methode die nicht normal verteilten Ergebnisse der ersten halben Stunde und ersten Stunde der Ischämie signifikant unter denen der zweiten Stunde der Reperfusion ( $365,91 \pm 196,34 \mu\text{M}$ ).

## Pyruvat in der Reperfusion



**Abb. 21 Mikrodialyse Pyruvat zu den einzelnen Reperfuionszeiten**

\* signifikant nach der Dunn's Methode zur ersten halben Stunde und ersten Stunde der Ischämie in der HTK-Gruppe

### 4.4.5. Darstellung der Laktat/Pyruvat Ratio in $\mu\text{M}/\mu\text{M}$ während der kalten Ischämie und Reperfusion

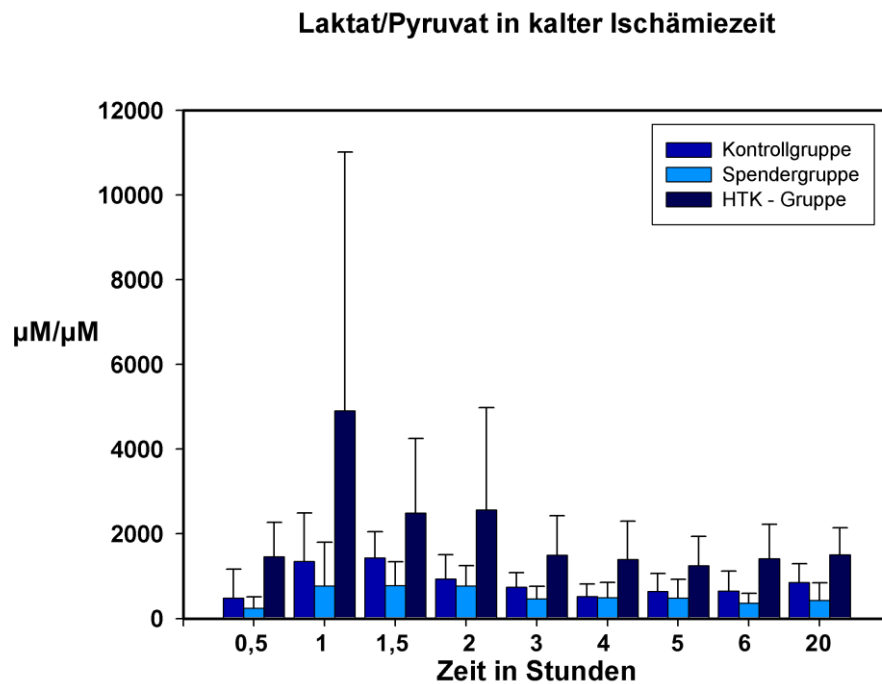
#### Die Laktat/Pyruvat- Ratio in den ersten sechs Stunden der kalten Ischämie

Die Laktat-Pyruvat-Ratio steigt in allen Gruppen bis zur eineinhalb Stunde an. Dann fällt Sie ab und zeigt eine schwankende Tendenz zwischen der dritten Stunde und 20.Stunde. Die Werte zwischen der dritten und 20. Stunde liegen in der Kontrollgruppe zwischen  $736,35 \pm 347,31$  (3. Stunde) sowie  $848,53 \pm 438,78$  (20. Stunde), in der Spendergruppe zwischen  $466,0 \pm 288,39$  (3. Stunde) und  $429,06 \pm 415,37$  (20. Stunde) und in der HTK- Gruppe zwischen  $1494,02 \pm 928,31$  (3.Stunde) und  $1504,38 \pm 641,1$  (20.Stunde).

Die höchsten Werte zeigen sich in der HTK- Gruppe zur ersten Stunde ( $4901,51 \pm 6117,53$ ) in der Spendergruppe bei eineinhalb Stunden ( $778,01 \pm 565,70$ ) und der Kontrollgruppe zur ersten Stunde ( $1735,55 \pm 1031,56$ ).

Die niedrigsten Werte sind in der Kontroll- und Spendergruppe nach der ersten halben Stunde; in der HTK- Gruppe bei fünf Stunden (1248,22 ±690,78).

Im Gruppenvergleich zeigt sich die niedrigste Laktat/Pyruvat-Ratio in der Spendergruppe zur halben Stunde (238,64 ±269,96), die höchste in der HTK- Gruppe bei einer Stunde (4901,51 ±6117,53).



**Abb. 22 Mikrodialyse Laktat/Pyruvat während der kalten Ischämie**

### Die Laktat/ Pyruvat- Ratio während der acht Stunden Reperfusion

In der Grafik zeigt sich ein deutlicher Abfall der Laktat/Pyruvat-Ratio zwischen der ersten halben Stunde und zweiten Stunde in allen Gruppen. Die höchsten Werte finden sich in der HTK-Gruppe zur halben Stunde (907,72 ±524,48).

Die niedrigsten Werte zeigen sich in der Spendergruppe in der achten Stunde (8,64 ±7,83). Während der Reperfusion liegen die Werte der Spendergruppe zu allen Zeitpunkten unter denen der Kontroll- und HTK- Gruppe.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

### Laktat/Pyruvat in der Reperfusion

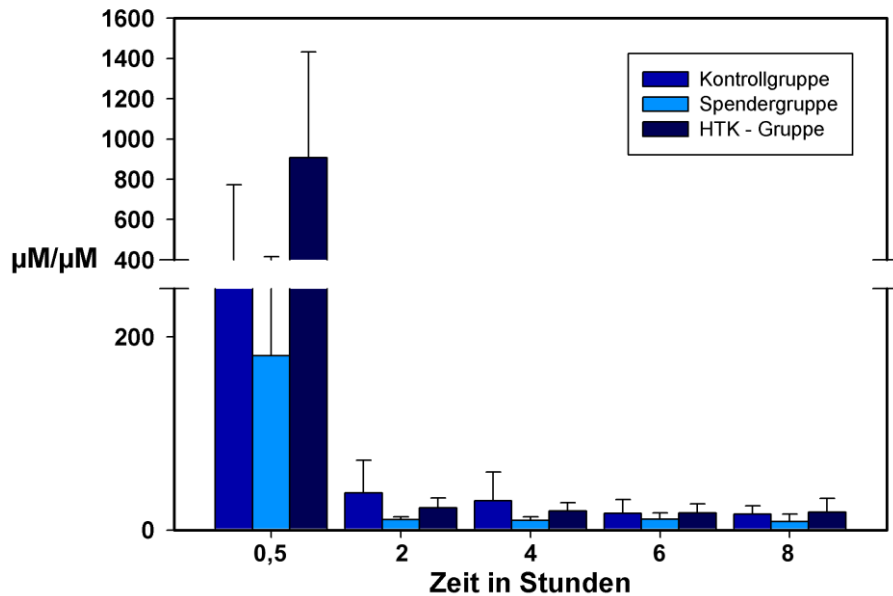


Abb. 23 Mikrodialyse Laktat/Pyruvat zu den einzelnen Reperfusionzeiten

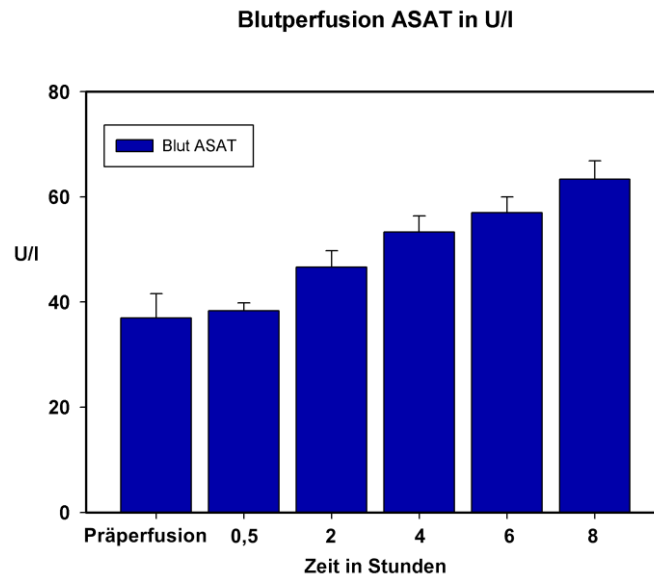
#### 4.5. Ergebnisse der Blutperfusion ohne Leber

##### 4.5.1. ASAT- werte der Blutperfusion

Die ASAT- werte zeigen während der Blutperfusion einen leichten Anstieg, aber keine signifikanten Unterschiede.

Sie liegen zu Beginn der Reperfusion nach einer halben Stunde bei  $38,33 \pm 1,53$  U/l nach acht Stunden bei  $63,33 \pm 3,51$  U/l.

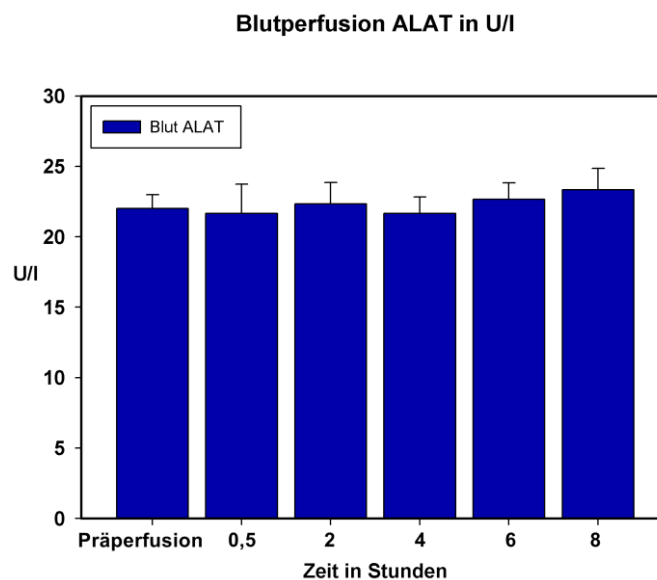
Beim Schwein sind die Normalwerte bis 35 U/l [58].



**Abb. 24 Blutperfusion ASAT in U/l**

#### 4.5.2. ALAT-werte der Blutperfusion

Die ALAT- werte im Blut liegen in den acht Stunden Reperfusion zwischen 22 und 23 U/l und zeigen keine signifikanten Unterschiede.



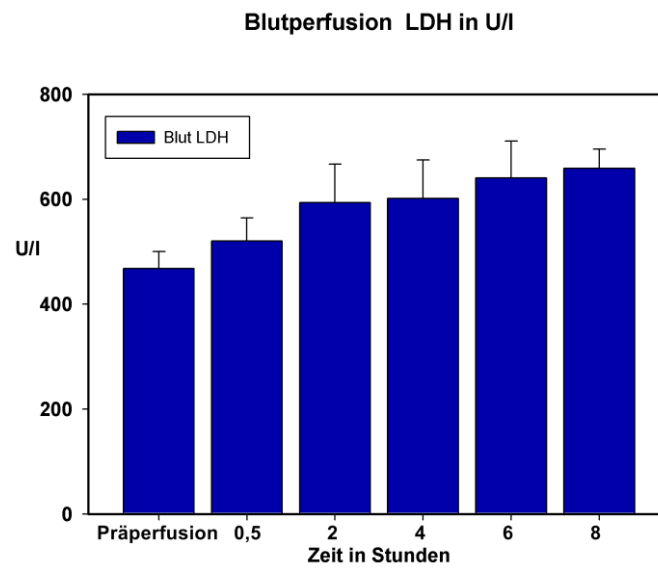
**Abb. 25 Blutperfusion ALAT in U/l**

#### 4.5.3. LDH-werte der Blutperfusion

Die LDH- werte zeigen einen minimalen Anstieg während der acht Stunden Perfusion. Die niedrigsten Werte sind  $520,33 \pm 43,89$  U/l. Die höchsten Werte liegen



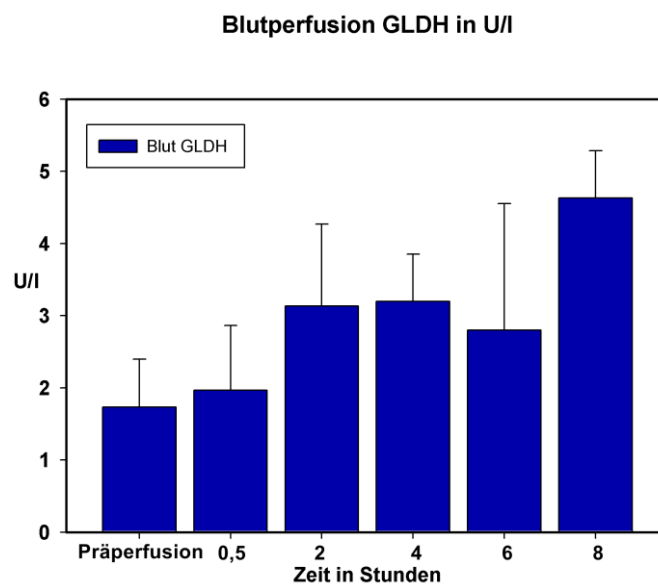
nach acht Stunden bei  $658,67 \pm 36,91$  U/l. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 26 Blutperfusion LDH in U/l**

#### 4.5.4. GLDH-werte der Blutperfusion

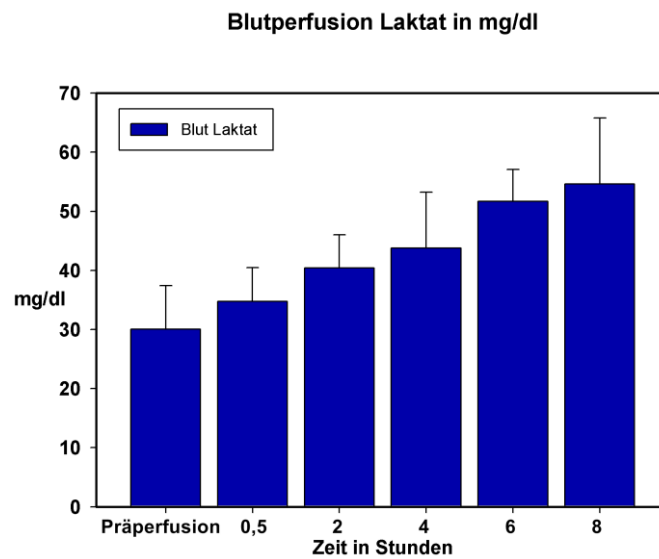
Die GLDH-werte schwanken. Sie liegen zwischen  $1,73 \pm 0,67$  U/l und  $4,63 \pm 0,65$  U/l (nach acht Stunden). Die Normalwerte beim Schwein liegen bei bis 4 U/l (Kraft W und Dürr UM 2005).



**Abb. 27 Blutperfusion GLDH in U/l**

#### 4.5.5. Laktatwerte der Blutperfusion

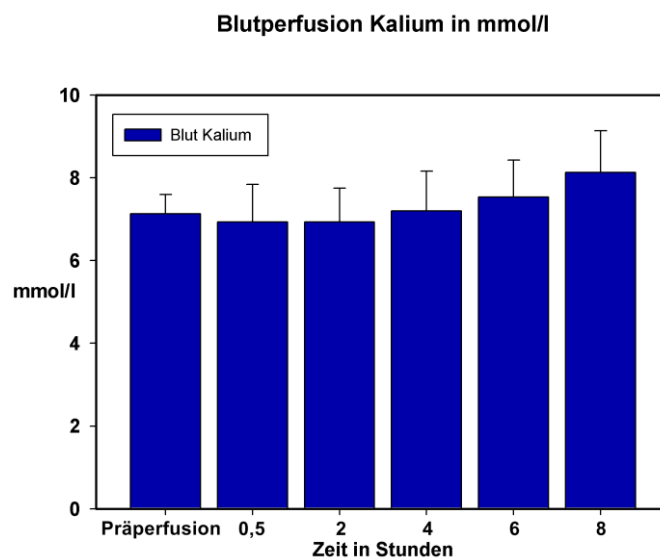
Die Laktatwerte der Blutperfusion zeigen einen leichten Anstieg der Werte.



**Abb. 28 Blutperfusion Laktat in mg/dl**

#### 4.5.6. Kaliumwerte der Blutperfusion

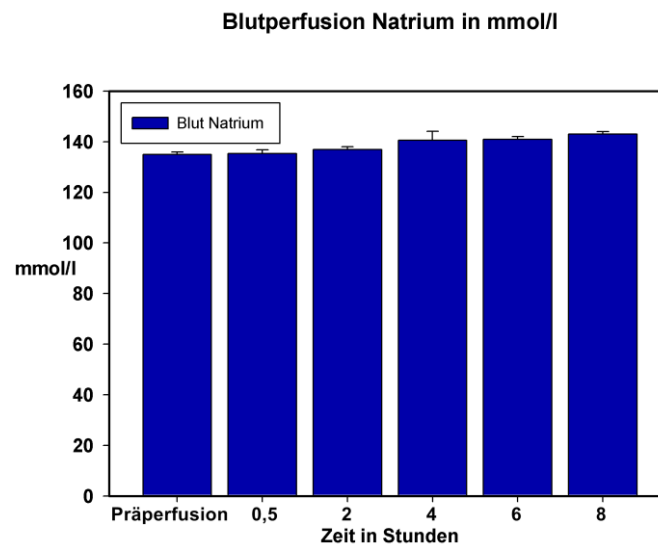
Die Kaliumwerte zeigen einen minimalen Anstieg während der Perfusion ohne signifikanten Unterschied.



**Abb. 29 Blutperfusion Kalium in mmol/l**

#### 4.5.7. Natriumwerte der Blutperfusion

Die Natriumwerte zeigen einen minimalen Anstieg von 135 mmol/l auf 143 mmol/l.



**Abb. 30 Blutperfusion Natrium in mmol/l**

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion Material**

#### **5.1.1. Schweineleber**

Die für dieses Experiment gewählte Schweineleber ist der Leber des Menschen bezüglich Größe, Gewicht, Makroskopie, Mikroskopie, Physiologie und dem Verhalten bei Schädigung ähnlich [20]. Schweinelebern wurde als Bestandteil assistierender Verfahren („bridgeing“) bei Patienten im Leberversagen verwendet [36-38]. In diesem Experiment wurden junge Schweine (10 - 16 Wochen) gewählt.

Um Einheitlichkeit bezüglich äußerer Einflüsse (Futter, Tierhaltung) zu bewahren, stammen alle Schweine vom gleichen Züchter. Es zeigten sich intraoperativ makroskopisch bei allen Schweinen keine tumorösen oder inflammatorischen Gewebeveränderungen.

#### **5.1.2. HTK und Konservierung**

Die HTK (Histidin, Tryptophan, Ketoglutarat) - Lösung, eingeführt durch H.J. Brettschneider besitzt eine im Vergleich zu z.B. University of Wisconsin-Lösung geringere Viskosität und wird regelhaft zur Konservierung abdominaler Organe beim Menschen verwendet. [6, 39-42].

Histidin wird eine Acidoseverminderung während der Ischämiezeit zugeschrieben. Histidin und Histidinchlorid sind potente Puffer. Im pH - Bereich von 6 - 8 hat Histidin im Vergleich zu herkömmlichen Puffern (Tham, Bikarbonat) die beste Pufferkapazität [44] und soll die Gewebsschädigung durch die Azidose während der hypothermen Ischämie vermindern [43].

Tryptophan beschränkt die Membranverletzung und dient ebenso als Puffer. Ketoglutarat wirkt sich positiv auf den Energiestoffwechsel aus [2, 43].

Der Viskositätskoeffizient der HTK - Lösung (bei 1°C) ist vergleichbar mit dem von destilliertem H<sub>2</sub>O. Damit ist eine vollständige homogene Ausspülung und Konservierung der Leber möglich [44].

Zusätzlich fanden Upadyha et al. Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen in der HTK - Lösung. Das Histidin in der HTK inhibiert Metalloproteinasen, die eine

gelatinolytische Aktivität besitzen [45] und innerhalb des Ischämie-Reperfusionsschadens von Sinusendothelzellen der Leber während der kalten Konservierung eine Rolle spielen [45]. Der genaue Wirkmechanismus der HTK ist nicht komplett verstanden [42].

Die leichtere Handhabung, niedrige Viskosität der HTK und nicht zuletzt die geringen Kosten sind für die klinische Anwendung optimal [41, 42].

Die HTK - Lösung erfüllt in der vorliegenden Arbeit die Anforderungen an eine Konservierungslösung, die in der Transplantationschirurgie gängig ist. Dies ist für eventuelle Schlussfolgerungen auf die Anwendung von Iloprost im klinischen Alltag wichtig. In diesem Experiment liegt die kalte Ischämiezeit bei 20 h.

HTK ist bei 20 h Ischämie nicht die optimale Konservierungslösung im Vergleich zur University of Wisconsin - Lösung (UW) [5]. UW- Lösung zeigte bei längeren Konservierungszeiten (>15h) bessere Ergebnisse [35]. Dass HTK effektiv ist bei langer und kurzer Konservierung, bestätigte sich in anderen Studien [6-8].

Schwierig ist es, die Ergebnisse verschiedenster Studien zu vergleichen, da unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt wurden.

Es können kalte Konservierungszeiten von 20 h – 24 h durch Konservierungslösungen erreicht werden [8, 46, 47]; doch sollte die angestrebte kalte ischämische Zeit unter 12 h liegen [48]. Die Äquilibration, das Angleichen der Elektrolytkonzentrationen des Interstitiums an die Elektrolytkonzentration der Konservierungslösung ist ein wichtiger Faktor für die erfolgreiche Konservierung und Protektion des Parenchyms [44].

In der Auseinandersetzung zur verbesserten statischen Kaltkonservierung stellt die Kombination von HTK als Flushlösung und UW als Konservierungslösung eine Möglichkeit dar, das Outcome von Rattenlebern zu verbessern [35].

Das Outcome eines Organs ist jedoch nicht allein von der Konservierungslösung abhängig. Leberart (Ratte/Schwein/Mensch), Art der Ischämie (Temperatur), Ischämiedauer, Sorgfalt der Ex- und Transplantation, Lagerung, Konservierung, Flushen nach der Explantation und vor der Implantation sowie Sterilität sind zu berücksichtigende Parameter.

Zur Konservierungsverbesserung schlagen Schön et al. die ECLP [49] bzw. Tolboom et al. die Kombination von statischer Kaltkonservierung und ECLP [50] vor.

Es wurde gezeigt, dass das Leberoutcome, Ischämie ausgesetzter Lebern, nach ECLP im Vergleich zur statischen Kaltkonservierung besser war [49, 51, 52]. Zur extrakorporalen Perfusion erfolgt eine gesonderte Diskussion unter 5.2.2.1.

### **5.1.3. Das Perfusat**

In diesem Experiment stellt Blut als Hauptbestandteil des Perfusats das physiologischste Medium dar. Die Blutperfusion kommt generellen Transplantationsbedingungen am nächsten. Eine Oxygenierung der Leber wird durch Erythrozyten und den im System eingesetzten Hämoxxygenator, der mit Sauerstoff persuffliert wird, gewährleistet.

Erythrozyten sind gleichzeitig Puffer für saure Valenzen [53]. Die Bestandteile des Blutes ermöglichen eine (physiologische), den Transplantationsbedingungen entsprechende Versorgung, Beeinflussung und Aufrechterhaltung der Leberfunktion, sind aber auch an einer Leberschädigung (Leukozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Komplementsystem) beteiligt. Dies wird ausführlich im Kapitel Ischämie-Reperfusionsschaden betrachtet.

Extrakorporale Perfusionen ohne Vollblut unter Verwendung modifizierter Perfusate (z. B. Krebs – Henseleit – Lösung) setzen sich mit der Auswirkung verschiedener Blutbestandteile (z. B. Leukozyten, Thrombozyten) in der Reperfusion auseinander [54-57]. So führt eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten zum erhöhten Leberschaden in der Reperfusion nach Ischämie. Die als Normwerte aufgeführten Blutparameter für Schweine (siehe Anhang, [58]) wurden bei Schweinen mit normalem Kreislauf ermittelt. Sie dienen als Anhaltspunkt aber nicht als Richtwerte für die Parameter, die in der extrakorporalen Perfusion ermittelt wurden.

Zur Verhinderung einer postischämisch auftretenden Zellschwellung erfolgte der Zusatz kolloidosmotischer Substanzen zur Perfusionslösung.

Die HAES 6 % dient dem Volumenersatz und der Hämodilution. HAES 6 % bewirkt eine Verbesserung des Kreislaufs sowie der Mikrozirkulation (Gebrauchsinfo HAES 6 %). Ziel ist es, dass nach 20 stündiger Ischämie die Leber unter Transplantationsbedingungen (O<sub>2</sub> - Gabe, CO<sub>2</sub>, Blut) ihre Funktion aufnimmt und der Ischämie-Reperfusionsschaden überwunden wird. Die Zugabe des Dialysats schafft einen HCO<sub>3</sub> - Puffer.

Die Verwendung des  $\text{HCO}_3^-$  - Puffers in der Perfusionslösung hat sich bereits in anderen Arbeiten [59] bewährt, weil ständig über flüchtiges  $\text{CO}_2$  Säure-äquivalente entstehen, die dann gebunden werden können [60].

PH und  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$  wurden während des Experiments permanent gemessen und zeigten sich stabil.

### Das Perfusat und der Versuchsaufbau

Eine Beeinflussung der Blutparameter durch die Versuchsbedingungen und das Aufbaumaterial wurde in der Literatur beschrieben [61, 62]. Um festzustellen, ob der dieser Arbeit zu Grunde liegende Versuchsaufbau eine Veränderung der Parameter verursacht, die während der Leberperfusion bestimmt wurden, untersuchten wir das Perfusat unter den gegebenen Versuchsbedingungen ohne das Organ.

Es ergaben sich durch den Versuchsaufbau bezüglich der in diesem Experiment zu untersuchenden Parameter leichte Anstiege bei den ASAT-, LDH- GLDH- und Laktatwerten. Diese zeigten keine signifikanten Unterschiede (siehe 4.5.). ALAT-Werte zeigten keine Veränderungen während der acht Stunden Blutperfusion.

Da es sich in diesem Versuch um ein Perfusat handelt, das aus Vollblut, HAES 6 %, Heparin, Tobramycin besteht, sind die Ausgangsbedingungen zu denen bei Pfeffer 2002 verschieden.

Die Werte der Leberperfusion sind pro 100g Leber berechnet, so dass die Werte der Leberperfusion zu denen der Blutperfusion verschieden sind.

Schlussfolgernd ist davon auszugehen, dass die in der extrakorporalen Leberperfusion bestimmten Parameter Folge der Ischämie und Reperfusion der Leber sind.

### Heparin und Tobramycin

Heparin und Antibiose sind schon bei Eiseman beschrieben [38]. Um eine Agglutination zu vermeiden, gaben wir im Schlachthof Heparin in das Vollblut, was als Perfusat diente. Intraoperativ gegeben ist Heparin die Voraussetzung für die Konservierung der Leber mit HTK (Gebrauchs- und Fachinformation Custodiol®).

Das Perfusat enthält Heparin, um eine Schädigung der Leber durch Agglutination des Blutes und folgenden Mikrozirkulationsstörungen auf das Minimalste einzuschränken.

Innerhalb des Perfusionssystems kann es z. B. im Auffanggefäß und im Reservoirbehälter zur Blutstase kommen.

Tobramycin ist ein Aminoglykosid (Antibiotikum) und wurde präventiv in das gewonnene Blut von Schlachthoftieren und ins Perfusat gegeben, um eine Schädigung der reperfundierten Leber durch Mikroorganismen, Bakterien im Blut zu minimieren.

Klinisch ist die Heparin- und Antibiotikagabe Standard. Die Zusammenstellung des Perfusats ist klinischen Gegebenheiten angepasst. Ziel ist es, ein Leberversagen zu vermeiden. Der Effekt von Iloprost auf das Leberoutcome lässt sich durch diese Voraussetzungen untersuchen.

## **5.2. Diskussion Methoden**

### **5.2.1. Operation bis Präperfusion**

#### **5.2.1.1. Das Operationsprozedere**

Die Explantation erfolgte stets durch das gleiche Operationsteam. Die Operationszeiten waren nicht signifikant unterschiedlich.

Es lagen somit für die zu untersuchenden Parameter optimale Bedingungen vor.

#### **5.2.1.2. Die Einleitung der kalten Konservierungslösung und intraoperative Kühlung**

Die Einleitung der kalten Konservierungslösung erfolgte in diesem Experiment ausschließlich über die Aorta, was einen Unterschied zum allgemeinen klinischen Operationsprozedere darstellt. Während des klinischen Operationsprozederes wird die Konservierungslösung bei manchen explantierenden Zentren über die A. hepatica und V. portae eingeleitet [1].

Die alleinige arteriell eingeleitete Konservierungslösung stellt eine Vereinfachung in unserem Versuchsablauf dar, wird jedoch ebenfalls in der klinischen Routine angewandt.



## Intraoperative Kühlung

Der warme Ischämieschaden, Infektionsschaden und die Stoffwechselprozesse werden durch die intraoperative Kühlung minimiert.

Allein die intraabdominale, intraoperative Kühlung mit NaCl wirkt organprotektiv [63, 64]. Mit Beginn des Verschlusses der Aorta und Einleiten der kalten Konservierungslösung wird die kalte Ischämie in diesem Experiment gewährleistet.

Nach Einleiten der kalten Konservierungslösung und Explantation wurde die Leber in kalter HTK - Lösung schwimmend bei 4° konserviert. Das in dieser Arbeit gewählte Prozedere reduziert den Anteil der warmen Ischämie auf ein Minimales.

Die Aufrechterhaltung der intraoperativ hergestellten kalten Ischämie wird durch die Kühlung der explantierten Leber in HTK bei 4°C erreicht.

### **5.2.1.3. Die Kanülierung/ Konnektierung der Gefäße**

Die Kanülierung/Konnektierung der Gefäße (A. hepatica und V. portae) nach Explantation wurden bereits bei Drapanas et al. und Abouna beschrieben[65, 66] und sind für einen zügigen Anschluss der Leber ans Perfusionssystem nach kalter Ischämie notwendig. Sie garantieren eine sichere Aufhängung der Gefäße und eine sichere Perfusion der Leber. Weiterhin bietet die Konnektierung mit Anschluss an das Schlauchsystem einen direkten Zugang zur arteriellen Druck- und Flusskontrolle.

### **5.2.1.4. 20 Stunden kalte Ischämie/ Konservierung**

Der Leberschaden ist von der Ischämieart (kalte versus warme Ischämie: Ikeda 1992[67]) und der Ischämiedauer abhängig.

Im vorliegenden Experiment steht die Dauer der kalten Ischämie mit 20 Stunden fest. Der Vorteil kalter Ischämien ist mehrfach nachgewiesen worden. Hypothermie schützt die Leber vor dem Ischämie- Reperfusionsschaden[64, 68], kann jedoch einer Membranzerstörung nicht entgegenwirken[35].

Kälte reduziert den Energieverbrauch (ATP- Verbrauch) durch die Reduktion der Stoffwechselprozesse (Zehnfache Stoffwechsel- Aktivitäts- Reduktion[2]): Die Organkühlung führt zur Abnahme des Zellmetabolismus durch Reduktion verschiedener organischer Reaktionen um das Zweifache alle 10 Grad Celsius.

Es resultiert eine Abnahme der O<sub>2</sub>- Nachfrage und somit der Schutz vor hepatischem Sauerstoffunterangebot durch Ischämie [63].

In der Diskussion um die optimale Konservierung beschäftigen sich Studien mit hypothermer Maschinenperfusion, wobei die optimale Konservierungstemperatur, die zwischen 12° und 20 - 22°C liegen soll [69, 70], noch nicht gefunden ist.

Die niedrige Temperatur, wie in unserem Experiment 4°C, führe nach Saad S 2008 zur Vasokonstriktion, woraus ein erniedrigter Blutfluss resultiert und damit eine Unterversorgung des Organs mit folgender Schädigung entstehen kann [69, 70].

Warme Ischämie führt zu einem ausgeprägten Schaden, nachgewiesen in mehreren Studien zu Non – Heart – Beating - Donors [22, 71]. Eine warme Ischämie von einer Stunde kann von der noch Leber toleriert werden [71, 72].

Nach 90 min normothermer Ischämie ist die hepatische Mikrozirkulation signifikant beeinträchtigt, aber unbeeinträchtigt nach hypothermer Ischämie bei 4-, 15-, 26- Grad Celsius [64].

Eine über 14 - stündige kalte Ischämie/Konservierung soll mit einem zweifach erhöhten Konservierungsschaden einhergehen, zu erkennen am postoperativen Verlauf, am Überleben der Tiere und dem Auftreten von Gallengangsstrikturen [2].

Koizumi 1989 fand bei der Schweineleberkonservierung in Euro Collins Lösung (EC) nach 12 Stunden einen sichtbaren Schaden. Dieser Schaden konnte nach 24 Stunden kalter Konservierung signifikant nachgewiesen werden [73].

Mit der Dauer der kalten Ischämie erhöht sich der Gallengangsschaden [9].

Steigt die Konservierungszeit von 17 auf 24 Stunden, reduziert sich die Wiederaufnahme der Galleproduktion von 73% auf 9%, was für einen Funktionsverlust der Leber spricht [9].

#### Der Ischämieschaden – intrazelluläre Vorgänge/ Veränderungen

Ein akuter Sauerstoffmangel verursacht Veränderungen der Zelle und letztendlich der Mitochondrien, die in Ihrer Funktion zusammenbrechen. Durch den Sauerstoffmangel reduziert sich die oxidative Phosphorylierung. Es resultiert ein ATP- Abfall. Infolge der ATP- Abnahme kommt es zum Anstieg der zytosolischen Proteasenaktivität mit anschließender Proteolyse [9].

Es entsteht eine erhöhte mitochondriale Permeabilität für Moleküle <1500 Da [74]. Dies zieht weitere Zellveränderungen nach sich.

Um den ATP- Gehalt zu erhalten, kommt es über die Stimulierung der Phosphofruktokinase zu einer vermehrten Glykogenolyse mit vermehrter anaerober Glykolyse. Die vermehrte anaerobe Glykolyse führt zum vorläufigen ATP- Erhalt. Jedoch liegt die Bildung von ATP durch die anaerobe Glykolyse deutlich unter der physiologischen ATP- Bildung durch die Atmungskette an der Mitochondrienmembran. Als Folge der mangelhaften ATP- Bildung steigt über die anaerobe Glykolyse das intrazelluläre Laktat. Der intrazelluläre pH fällt. Es resultiert eine metabolische Azidose. Die intrazelluläre Azidose kann lysosomale Enzyme aktivieren und damit zur Bildung freier Sauerstoffradikale führen, (die eine Kettenreaktion der Zellzerstörung auslösen). Durch den Abfall des pHs und des ATP- Spiegels fallen die ATP abhängigen Ionenpumpen (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase) der Zell- Plasmamembran aus. Natrium, Calcium, Wasser strömen in die Zelle und in einzelne Zellkompartimente ein [75].

Ultrastrukturell erkennt man eine vakuolige Degeneration des Endoplasmatischen Retikulums, die mit einer Störung der Proteinsynthese einhergeht. Apikale Zellödeme mit bläschenförmigen Zytoplasmaausstülpungen [76], die durch die Calcium abhängige Schädigung des Cytoskeletts entstehen, werden sichtbar [75].

Weiterhin treten Mitochondrienschwellungen auf [77]. Durch die Hypoxie und kalte Konservierung wird das mitochondriale Membranpotential zerstört [78]. Letztlich folgt eine degenerative Zellkernschwellung. Energieabhängige Transkriptionsvorgänge erlöschen, DNS – u. RNS - Synthese sind vermindert oder fehlen. Das Chromatin verklumpt. Der Ischämieschaden endet in der Pyknose und lysosomalen Auflösung der Zelle. Die Zelle nekrotisiert [55, 76, 79, 143].

Die Entwicklung von Konservierungslösungen kombiniert mit Hypothermie führt zum Organerhalt trotz einer länger andauernden Ischämie (2 - 10 h). Die einzelnen Zusammensetzungen der Konservierungslösungen versuchen das Energiedefizit auszugleichen, den pH konstant zu halten, zu puffern und die Zelle in ihrer Struktur zu erhalten.

Jedoch führen längere Konservierungszeiten ebenso zum ATP- Abfall in der Leber [9].

Bei Schweinen führten die ersten 12 h Konservierung zum Abfall von 80 % der Energie- Adenylate [9]. Zum Ischämie- Reperfusionsschaden erfolgt eine gesonderte Diskussion unter 5.2.2.2.

## **5.2.2. Reperfusion**

### **5.2.2.1. Extrakorporale Leberperfusion (ECLP)**

Die extrakorporale Perfusion ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung des Ischämie/ Reperfusionsschadens [19-22]. Der 2002 erschienene Review Artikel zum Thema extrakorporale Leberperfusion (ECLP) in der Klinik als hepatische Unterstützung bei akutem Leberversagen von Pascher et al. gibt einen Überblick über die Erfahrung mit allogener und xenogener extrakorporaler Leberperfusion von 1964 - 2000. Die ECLP mit Schweine- oder Menschenlebern bis zur Lebertransplantation scheint eine ähnliche Effizienz zu haben wie bioartificielle Unterstützungsmethoden[80].

Die explantierte Leber kann durch die extrakorporale Perfusion unter bestimmten maschinellen Voraussetzungen funktionell aktiv erhalten werden [21, 49, 81].

Schon vor 1964 wurden erste Leberperfusionen durchgeführt. 1942 wurden von Trowell Rattenlebern perfundiert [82].

Schön et al. berichteten 2001 von einer 100%- Überlebensrate von Schweinen, denen eine Leber transplantiert wurde, die einer warmen Ischämie von 60 Minuten unterzogen war. Der Grund für die 100% - ige Überlebensrate war eine normotherme extrakorporale Perfusion der ischämischen Lebern für vier Stunden vor der Transplantation. Bei Konservierung der ischämischen (60 min) Lebern in UW für vier Stunden, überlebte kein Schwein nach Transplantation [49]. Fondevila C 2011 unterstreicht die Aussage von Schön 2001. Durch die normotherme extracorporale Membranoxygenierung und vier Stunden ex vivo normotherme Maschinenperfusion konnten Schweinelebern, die einer Herzstillstandsituation von 90 min ausgesetzt waren, transplantiert werden und zeigten eine fünf Tages-Überlebensrate von 100%. Die Transplantation der Lebern, die einer Herzstillstandsituation von 90 min ausgesetzt waren und danach kalt konserviert wurden, zeigten eine fünf-Tages-Überlebensrate von 0%[83].

Durch die extrakorporale Leberperfusion kann jegliche Beeinflussung, Schädigung oder medikamentöse Behandlung einer Leber unabhängig von anderen Organsystemen kontrolliert untersucht werden. [20, 22]. Die ECLP ist ein Modell, um beispielsweise die Effektivität von Konservierungslösungen zu testen [20].

In der vorliegenden Arbeit wurde die extrakorporale Leberperfusion durch den beschriebenen Versuchsaufbau ermöglicht und stellt einen rezirkulierenden Kreislauf dar, in dem die Stoffaufnahme und -abgabe über das Perfusionsmedium erfolgt. Das Perfusionsmedium, das im ständigen Kontakt mit der Leber steht, dient der Aufnahme und Abgabe von Materie durch die Leber. Die Bestimmung von Schädigungs- und Funktionsparametern kann aus dem Perfusionsmedium erfolgen. Die lebererhaltende Reperfusion wird in diesem Experiment durch die Konnektierung und freie Aufhängung der A. hepatica und V. portae, den kontrollierten Einsatz von Rollerpumpen in der Zirkulation, die stündlich druck- und flusskontrollierte arterielle Versorgung der Leber erreicht [19, 21, 66].

Eine freie Aufhängung der Gefäße (V. portae und A. hepatica) verhindert die Kompression derselben durch die Lebermasse. Allein eine Obstruktion und inhomogene Perfusion der Portalvene würde zur Funktionseinschränkung der Leber führen.

Mit der arteriellen und portalvenösen Blutversorgung ist dieser Versuchsaufbau denen mit einseitiger portaler Blutversorgung überlegen [66]. Eine arterielle und portalvenöse Blutversorgung führt zu einer vermehrten Galleproduktion [66, 84].

Durch die freie Aufhängung der Gefäße ist eine Hyperperfusion der Leber nicht auszuschließen. Die arterielle Perfusion wird in unserem Versuchsaufbau durch die arterielle Druck- und Flusskontrolle reguliert.

Die Perfusion der V. portae erfolgt passiv aus dem mit Perfusat gefülltem Reservoirbehälter. Die Höhendifferenz des Flüssigkeitsspiegels im Reservoir zum Leberhilus ergab einen Perfusionsdruck von 20 cm Wassersäule. Über die Pumpe 1 konnte der Perfusatspiegel im Reservoir bei 20 cm Wassersäule konstant gehalten werden. Dies entspricht einem Druck von ca. 27 mmHg.

Fluss- und Druckverhältnisse sind durch die Rollerpumpen optimiert. Das vollständig freie Schwimmen der Leber im Perfusat ist eine Vereinfachung in unserem Modell. Eine frei schwimmende Leber ist geschützt vor Druck-, Kompressionsschäden sowie Verletzungen [19, 22].

Als optimal wird die Lagerung der Leber in einem oszillierenden, geschlossenen System angesehen, welches die intraabdominalen Zwerchfellbewegungen nachahmt [21].

Die Temperatureinstellung und Aufrechterhaltung wie sie den physiologischen Verhältnissen beim Schwein entspricht, wurden durch den Wärmetauscher und

durch das Perfusat gewährleistet. Es konnte durch das freie Schwimmen der Leber im Perfusat des Sammelgefäßes eine Temperaturkonstanz der perfundierten Leber erreicht werden. In unserem Experiment blieb der Aufbau übersichtlich. Er erfüllte mit druck- und flusskontrollierter arterieller Versorgung, über Rollerpumpen angetriebener portaler Versorgung, die Sauerstoffgabe, die Überwachung des pH, pCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> und eine Temperaturkonstanz die Hauptkriterien der Leberperfusion. Neuhaus et al. 1993 beschrieben die Grundvoraussetzungen für eine funktionserhaltende Leberperfusion. Wichtig für die optimale lebererhaltende extrakorporale Reperfusion sind nach Neuhaus et. al sowie Drapanas et al. eine druck- und flussüberwachte Perfusion; ein O<sub>2</sub> & CO<sub>2</sub> - Mix und die Nachahmung intraabdomineller Verhältnisse[21, 66].

Die portale Blutzufuhr blieb bei 20 cm über der frei schwimmenden Leber, um den intraabdominellen Druckverhältnissen nahe zu kommen.

#### Flushen der Leber nach Konservierung

Das Flushen der Leber vor Transplantation ist wichtig für ein erfolgreiches Leberoutcome[19, 35, 42, 85, 86]. Unterschiedliche Flushlösungen (UW als flush bei Adham et al.; HTK bei Puhl et al.) wurden beschrieben [19, 35]. In allen Studien wurden durch das Flushen unabhängig von der Flushlösung verbesserte Leberfunktionen nachgewiesen. In Anlehnung an bestehende etablierte Standards erfolgte in unserem Experiment das Flushen.

Flushen und Kühlen bei NHBD wirkt sich positiv auf das Leberoutcome [87] aus. Das Flushen vor der Konservierung dient dem Blutausschwemmen. Nach der Konservierung dient es der Minimierung der Agglutinationsgefahr beim Durchfluss von allogenen Blut und dem Ausspülen von Konservierungslösung sowie Metaboliten.

Das Flushen der Leber mit Hämofiltrationslösung über die V. portae nach 20 Stunden kalter Ischämie schwemmt Metabolite, die sich während der Ischämie gebildet haben, sowie Reste der Konservierungslösung aus [2, 85].

Anhand der in dem vorliegenden Experiment gemessenen Effluatwerte, die hohe Kalium-, Calciumwerte aufweisen, erkennt man die Bedeutung des Flushens.

Im Transplantationsprozedere ist der Flush eine Voraussetzung, um Schadstoffe in der Leber vor Implantation zu vermindern und damit posttransplantations-

Komplikationen, die sich für den Empfänger (aus z. B. zu hohen Kaliumwerten) ergeben, zu minimieren.

Die Konservierungssituation wird mit dem Flushen beendet und im Organ wird vor der Implantation bzw. extrakorporalen Perfusion eine bessere Ausgangssituation für das Leberoutcome im annähernd physiologischen Milieu geschaffen. Flushen der konservierten Leber nach der kalten Ischämie reduziert den Endothelzellschaden und die Kupfferzellaktivität. Somit verbessert es das Überleben des Organs[88].

Van Wagenveld et al. empfahlen, dass nach kalter Konservierung die Temperatur der Flushlösung bei 37° liegen sollte[89].

In unserem Experiment lag Sie für alle Gruppen gleichermaßen bei Raumtemperatur.

#### **5.2.2.2. vom Preflush nach 20 Stunden kalter Ischämie zur Reperfusion**

Die Reperfusion unter physiologischen Bedingungen ist normotherm und beendet den hypoxischen Zustand des Organs. Sie ermöglicht den Ausgleich der Sauerstoffschuld nach der Ischämie.

In extrakorporalen Reperfusionskreisläufen lässt die normotherme Reperfusion nach einer Ischämie das Studium zu morphologischen, funktionellen und biochemischen Veränderungen der Leber, wie sie bei Transplantierten auftreten können, zu [81].

Um annähernd klinischen, physiologischen Gegebenheiten zu entsprechen, wählten wir in dieser Arbeit die normotherme Reperfusion.

#### Der Reperfusionsschaden

Der Reperfusionsschaden kann nicht unabhängig von der Ischämie betrachtet werden. Die Ischämie geht der Reperfusion immer voraus. Sie ist aber nicht die alleinige Ursache für die beobachteten Leberschäden nach Transplantation.

Das Zusammenspiel von Ischämie und Reperfusion führen zu den viel beobachteten Veränderungen der Leber.

#### Der Ischämie- Reperfusionsschaden

Der Ischämie- Reperfusionsschaden ist ein multifaktorieller Prozess [90]. Erkennbar ist der Ischämie- Reperfusionsschaden an morphologischen, funktionellen, einschließlich quantitativen, qualitativen zellulären und interzellulären Verän-

derungen. Die Beurteilung und Auswertungen erfolgen oft lichtmikroskopisch und/oder elektronenmikroskopisch [76].

Parenchymale Zellen (Hepatozyten) und nicht parenchymale Zellen (Sinusendothelzellen, Kupffersche Sternzellen, vaskuläre Endothelzellen, ITO - Zellen) der Leber unterliegen dem Ischämie- Reperfusionsschaden.

### Stand des Wissens zum Ischämie/ Reperfusionsschaden

Eine ausführliche Darstellung zu Erkenntnissen des Ischämie- Reperfusionsschadens geben der Review Article von Dogan et al. [91] und von Teoh et al. 2003 sowie 2011 wieder [74, 92].

In der Hypoxie verändern sich die Zellen der Leber bezüglich der Zellmembranbeschaffenheit und der Zellorganellen, wie bereits beschrieben. Unterschieden wird der warm ischämische Reperfusionsschaden zum Reperfusionsschaden nach kalter Konservierung [92].

Während der Reperfusion differenziert man den Initialschaden (eins bis sechs Stunden) und Folge-schaden/Spätschaden (6 – 48 Stunden) [91].

Immunzellen (Kupfferzellen, Leukozyten, Lymphozyten) werden über die Interaktion mit geschädigten Zellen (Hepatozyten, Endothelzellen) aktiviert. Aktivierte Kupfferzellen und Neutrophile bilden Sauerstoffradikale und Mediatoren. Ein Überschuss an proinflammatorischen Mediatoren (TNF $\alpha$ , IL-18, IL-6, IL 1, PAF und Leukotriene), die durch Kupfferzellen, Neutrophile und geschädigte Zellen (Endothelzellen, Hepatozyten) freigesetzt werden, führen zur weiteren Aktivierung von Neutrophilen und zur Chemotaxis sowie einer folgenden Überexprimierung von Adhäsionsmolekülen an Sinusendothelzellen und Hepatozyten [93-96]. Die Hochregulation von ICAM wurde in mehreren Studien nachgewiesen [96-99]. Die Expression von TNF $\alpha$ , IL 12, IL 1 $\beta$ , die zu den proinflammatorischen Molekülen zählen, wird durch den – Transkriptionsfaktor- NFkappa b, und Hif 1a getriggert [92].

Die vermehrte Bildung von Cytokinen wird auf Toll-like Rezeptoren (TLR) zurückgeführt. Dies sind transmembranöse Rezeptoren, über die die Signaltransduktion in den Zellkern via NFkappa b und MAP - Kinasen erfolgt. Folglich wird im Zellkern über NFkB die Transkription von Cytokinen und Chemokinen induziert [92]. Die Auf- und Abregulierung von TLR steht wiederum in Zusammenhang mit den Immunzellen.



Nach kalter Ischämie wird in jeder Minute der Wiedererwärmungsphase/ Reperfusionphase die sekretorische Leberfunktion mehr geschädigt als in jeder weiterlaufenden Stunde der kalten Konservierung [9].

Durch die erhöhte Anziehung, Aktivierung, Adhäsion, Migration von Neutrophilen Zellen (PMN - polymorphonuclear cells) in die Leber kommt es zu Mikrozirkulationsstörungen. Die vermehrte Leukozytenadhäsion in der Leber nach der kalten Konservierung führt zum Leberschaden [54] und ist zeitabhängig [5]. Den auftretenden Imbalancen zwischen Oxidation und Antioxidation, Endothelin-1 und PG bzw. NO, Vasokonstriktor und Vasodilatator, sowie anderen Mediatoren folgen Mikrozirkulationsstörungen und die Bildung freier Sauerstoffradikale [74], was eine Minderperfusion sowie den Zelltod zur Folge hat.

In der Diskussion um Apoptose und Nekrose, die in der Leber in Zusammenhang mit dem Ischämie- Reperfusionsschaden nachgewiesen werden können [73, 100, 101], führten Jaeschke and Lemasters 2003 den Begriff „Necrapoptosis“ ein [76]. Apoptose und Nekrose treten nebeneinander auf, können teils jedoch nicht unabhängig voneinander betrachtet werden [76].

In Bezug auf den Ischämie- Reperfusionsschaden ist das pH paradox sicherlich eine Ursache für die Zellschädigung. In der Ischämie sinkt physiologisch der pH, was vor einer Nekrose schützt (abhängig von der Dauer der Ischämie).

Der durch die Reperfusion herbeigeführte normale pH bei ischämischen Zellen führt zum Zelltod über die mögliche Aktivierung von Phospholipasen [102].

Da ein physiologischer pH die Zelle nicht zerstören sollte, spricht man von einem pH paradox [74]. Caldwell-Kenkell et al. zeigten, dass ein leicht saurer pH innerhalb der Zellreperfusion protektiv wirkt [103].

Iloprost, ein PGI<sub>2</sub> - Präparat, scheint mit seinen Eigenschaften eine Substanz zu sein, die den Ischämie- Reperfusionsschaden vermindern kann.

PGI<sub>2</sub> wird physiologisch als antiinflammatorischer Mediator vom Endothel zur Protektion freigesetzt. In der Literatur wird dem PGI<sub>2</sub> eine TNF $\alpha$  - inhibierende Wirkung zugeschrieben. TNF $\alpha$ , was von Monozyten produziert wird [104], gilt als proinflammatorisches Zytokin, induziert die IL- 8 - Bildung, die wiederum zur Leukozytenaktivierung führt. Durch PGI<sub>2</sub> wird dies inhibiert [96, 104-106]. Iloprost verursacht eine Downregulierung der zytokininduzierten Überexpression. Dabei kommt es zu einem intrazellulären cAMP - Anstieg [107, 108].

1997 beschreiben Braun et al. an vaskulären glatten Muskelzellen, dass die Expression von ICAM und VCAM, die durch TNF $\alpha$  sowie IL1 $\beta$  induziert wird, durch die Zellinkubation mit PGI $_2$  signifikant inhibiert wird [109].

Jedoch scheint die Aktivierung der Zellen eine Rolle zu spielen. Wenn Endothelzellen von HUVEC (human umbilical venol endothelial cells) unaktiviert/unstimuliert sind, zeigten Bella et al., dass Iloprost keinen Effekt auf die Adhäsionsmolekülexpression hat [110].

### **5.3. Diskussion Ergebnisse**

#### **5.3.1. Diskussion Laborparameter (Schädigungsparameter)**

In der Zusammenschau der Literatur zeigt sich, dass Autoren unterschiedliche Parameter wählen, um die Leberfunktion zu beurteilen. Anhand der Galleproduktion, des Bilirubins, des Faktor V wurde die Leberfunktion beurteilt [19].

Die Galleproduktion gilt bei Chari et al. als sensitivster Parameter [37]. Die Leberfunktion/ Galleproduktion ist in diesem Experiment untersucht worden, wurde jedoch in einer anderen Dissertation (Junge [111]) beschrieben.

Ein Indikator für einen Leberschaden ist der Transaminasenanstieg (ASAT und ALAT), die verminderte Galleproduktion und der Hyaluronsäureanstieg, der für einen Sinusendothelzellschaden spricht.

„Ein definitiver Parameter, der exakt die Explantatfunktion widerspiegelt, ist nicht etabliert“ (Neuhaus, 2005) [1]. Gallefarbe und –menge sowie ein ASAT - Anstieg sind als sensitiv für ein Leberversagen beschrieben [20].

Eine fehlende Galleproduktion [37] in Kombination mit einer schlechten Syntheseleistung deutet auf eine initiale Nichtfunktion der Leber hin [1,145], die eine Retransplantation erfordert.

Die verminderte ATP- Bildungsfähigkeit geht mit einer Schädigung der Leber einher. Hepatische Zytolyse, ansteigende Transaminasen, eine verminderte Galleproduktion, hohe Laktatlevel sind Zeichen eines ausgedehnten Leberschadens und des Transplantatversagens [137].

In diesem Experiment definieren die makroskopischen Befunde, die Gewichtszunahme, ASAT, LDH, ALAT und die per Mikrodialyse erhobenen Glycerinwerte [137, 35] die Leberschädigung.

Die effektive Behandlung mit Iloprost wurde in dieser Arbeit anhand der gewählten Parameter untersucht. Die Galleproduktion, Mikrozirkulation und Makrozirkulation sind Teil einer anderen Dissertation [111].

Die als Normwerte aufgeführten Parameter (siehe Anhang) wurden bei Schweinen mit normalem Kreislauf ermittelt. Sie dienen als Anhaltspunkt aber nicht als Richtwerte für die Parameter, die in der extrakorporalen Perfusion ermittelt wurden. Eine Einschätzung der Perfusatparameter in der Reperfusion lässt sich zu den erhobenen Ausgangswerten (Parameter der Präperfusion) treffen.

In der Klinik dient der ASAT - Spiegel der Beurteilung der Leberschädigung [112, 113]. Im Schweinmodell sind die ASAT und LDH akzeptierte Werte zur Beurteilung und Verlaufsbeobachtung des hepatozellulären Schadens [59].

#### Die ASAT (Aspartat - Aminotransferase)

Die ASAT ist ein Enzym, das die Transaminierung von Aspartat zu Oxalacetat katalysiert. Sie gehört zu den Transaminasen und befindet sich im Cytosol. In der Literatur sind deutliche ASAT - Anstiege nach 18 Stunden kalter Ischämie, moderate ASAT - Anstiege nach sechs Stunden kalter Ischämie [20] beschrieben. Eine positive Korrelation zwischen den postoperativen ASAT- Serum- Leveln und dem Initialschaden konservierter, transplantierte Menschenlebern wurde ausserdem bei Glanemann et al. beschrieben [114].

#### Die LDH (Laktatdehydrogenase)

Die LDH ist ein tetrameres Enzym zur Umwandlung von Pyruvat in Laktat während der anaeroben Glykolyse. Sie ist ein zytoplasmatisches Glykolyseenzym. Die LDH gehört zu den Isoenzymen. In der Leber finden sich LDH - 4 und LDH - 5. [115]

#### Die ALAT (Alanin-Aminotransferase) und GLDH (Glutamatdehydrogenase)

ALAT und GLDH sind Parameter, die auf einen schweren Leberschaden hinweisen. Sie sind mitochondriale Enzyme. Die GLDH katalysiert die oxidative Desaminierung von Glutamat in alpha - Ketoglutarat. Das dabei entstehende überschüssige NH<sub>4</sub><sup>+</sup> wird in Harnstoff fixiert. Werden ALAT und GLDH im Blut nachgewiesen, sind die

Zellfunktion und die Mitochondrien geschädigt. Es wurden in diesem Experiment niedrige Konzentrationen nachgewiesen. Es traten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.

Die höchste Aktivität der GLDH liegt in Lebermitochondrien vor. Eine Erhöhung spricht für einen Lebergewebezerfall [34].

Das Effluat, das durch das Flushen der Leber gewonnen wurde, zeigte erhöhte GLDH - Werte. Dies spricht für eine ausgeprägte Schädigung während der kalten Ischämie. In der Reperfusion sind die GLDH - Werte niedrig.

Da die GLDH - Werte in allen Gruppen während der achten Reperfusionsstunde ansteigen, ist von einer erhöhten mitochondrialen Schädigung auszugehen. Die hohen GLDH - Werte in der HTK- Gruppe, die höchsten in den Iloprost behandelten Gruppen, sind nicht normal verteilt.

### **5.3.2. Vergleich aller mit Iloprost behandelten Gruppen zur Kontrollgruppe**

#### **5.3.2.1. Makroskopie und Gewichtszunahme**

Die prozentuale Gewichtszunahme zum Ausgangsgewicht liegt in der Spenderbehandlung signifikant unter der Kontrollgruppe. In den anderen Iloprost behandelten Gruppen ist das Lebergewicht nach der Reperfusion niedriger als in der Kontrollgruppe. Gründe für eine Gewichtszunahme sind Ödeme infolge einer Zellinsuffizienz, Wassereinlagerung und Zellschwellung aufgrund des Ischämie-Reperfusionsschadens [116]. Die Gewichtszunahme kann zusätzlich durch eine Hyperperfusion verursacht sein.

Da alle Gruppen den gleichen Versuchsbedingungen unterliegen, ist eine etwaige Hyperperfusion, die auf das Minimalste beschränkt wurde, immer die gleiche.

Makroskopisch zeigt sich in den Gruppen, die kurz vor (Spendergruppe) bzw. zu Beginn (HTK-gruppe) der kalten Ischämie mit Iloprost behandelt wurden, ein deutlich besseres Outcome.

Der signifikant bessere makroskopische Score der Spendergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unterstützt die Aussage, dass die Spenderbehandlung die optimale Iloprostbehandlung darstellt.

### **5.3.2.2. Laborparameter ASAT, ALAT, GLDH, LDH**

#### Spendergruppe zur Kontrollgruppe

Steininger et al. beschrieben den positiven Effekt des intraportal 15 min vor der Ischämie bis zu 30 min nach der Reperfusion verabreichten PGI<sub>2</sub>s. Das Experiment erfolgte mit Schweinelebern, die einer zwei-stündigen normothermen Ischämie ohne Konservierung ausgesetzt wurden. Die ASAT und LDH lagen in der PGI<sub>2</sub> - behandelten Gruppe signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe[117].

Goto et al. beschrieben Leberlappentransplantationen bei Ratten nach 30 min warmer Ischämie. Durch die PGI<sub>2</sub> - Gabe (500 ng/kg/min) während der Spender - OP wurde das Überleben der Empfänger nach Lebertransplantation verbessert[118].

Die Iloprost - Applikation während der Ischämie wurde von Gedik et al. an Rattenlebern untersucht. Nach 45 min warmer Ischämie durch Abklemmen der Gefäße zeigte sich durch die Iloprostapplikation vor Reperfusion ein signifikant besseres Outcome der Rattenleber[119].

Die Ergebnisse unseres Experiments untermauern und bestätigen den positiven Einfluss der Behandlung der Spenderleber mit Iloprost anhand signifikant niedriger ASAT – Werte, geringer makroskopischer Veränderungen und signifikant niedriger LDH - Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ebenso beschrieben Klein et al. eine signifikante Senkung der Transaminasen durch die Behandlung menschlicher Spenderlebern mit Iloprost vor der Konservierung (mit UW). Die Ischämiezeit lag bei maximal 10 Stunden und ist somit geringer als in unserem Experiment [120].

Die Ischämiezeiten der angeführten Literatur lagen alle deutlich unter 20 Stunden. Im vorliegenden Experiment zeigte sich nach 20 Stunden kalter Konservierung, also bei als marginal anzusehenden Spenderorganen ein verbessertes Leberoutcome durch die Spenderbehandlung mit Iloprost.

#### Konservierungslösungsbehandlung ( HTK- Gruppe) zur Kontrollgruppe

Die ASAT- Werte der HTK- Gruppe waren ab der vierten Stunde der Reperfusion signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Die LDH- Werte lagen nach sechs und acht Stunden signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe. Die ALAT- Werte waren geringer als in der Kontrollgruppe. Iloprost verbessert das Outcome der Leber

in Hinblick auf die Transaminasen und die Makroskopie, wenn es zur Konservierungslösung hinzugefügt wird.

Die Konservierungslösungsbehandlung ist unter anderem in der Arbeit von Monden et al. als effektiv beschrieben. Unter Prostacyclinzusatz zur Sacks Solution zeigten die nach 24 Stunden Ischämie transplantierten Hundelebern im Verlauf deutlich niedrigere Transaminasen als die nicht behandelten Hundelebern [121].

Sanchez– Urdazpal et al. zeigten an Rattenlebern, dass die Überlebensrate (36h) bei Iloprost behandelten Gruppen signifikant besser war. Das Iloprost wurde wie in unserem Experiment zur Konservierungslösung hinzugefügt und die Leber wurde bei 4°C kalt konserviert [122].

Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit betrug die Ischämie bei Sanchez - Urdazpal 12 Stunden und es wurden andere Konservierungslösungen (EC und UW) verwendet.

Durch Zugabe von PGI<sub>2</sub> zur Konservierungslösung beschrieben Toledo et al. eine erfolgreiche 24 Stunden Konservierung bei sechs von sechs Hunden. Endpunkt stellte die Überlebensrate dar. Die Zugabe von PGI<sub>2</sub> zur Konservierungslösung verbesserte signifikant die Überlebensrate von ischämisch geschädigten Lebern nach 24 Stunden hypothermer Konservierung [123].

Der Vergleich ist bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen schwierig, da die Einflussfaktoren im Experiment für die Ergebnisse entscheidend sind (Konservierungslösung, Art der Leber (Schwein, Ratte, Hund), Ischämiezeit). Trotz unterschiedlicher Versuchsbedingungen zeigt sich immer der positive Effekt des Prostacyclins (=PGI<sub>2</sub>, Iloprost).

Eine Erklärung für den Effekt des PGI<sub>2</sub>s bieten Araki et al.: Es wird vermutet, dass das Prostacyclin, was zur Konservierungslösung gegeben wird, die lysosomalen Membranen stabilisiert und die cytoplasmatischen Schädigungsprozesse während der Konservierung minimiert [16].

Die laborchemischen Schädigungsparameter zeigen, dass Iloprost die Leberzellintegrität im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert. Es minimiert den Leberschaden durch die Ischämie und Reperfusion.

Die GLDH - Werte stellen eine Ausnahme dar. Diese sind in der zweiten Stunde in der HTK- Gruppe am höchsten, zu den restlichen Stunden nicht normalverteilt.

### Reperfusatbehandlung zur Kontrollgruppe

Eine Erniedrigung der ASAT - Werte nach der Lebertransplantation bei Menschen unter postoperativ gegebenem Prostacyclin ist bei Neumann et al. beschrieben. Dabei erfolgte die Konservierung mit UW, die Ischämiezeit betrug maximal 14 Stunden [112, 113].

Harada et al. zeigten bei Rattenlebern durch die Prostacyclingabe während der Reperfusion eine signifikante Reduzierung der Transaminasenausschüttung, eine Erhöhung des Blutflusses und eine Aktivitätsminderung der MPO nach 60 min normothermer Ischämie [105].

In unserem Experiment sind wie bei Neumann et al. die Transaminasen der Reperfusatgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger [113]. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Daraus lässt sich schließen, dass die Iloprost - Gabe nach der kalten Ischämie effektiv für das Leberoutcome ist, jedoch die Ischämiezeit einen ausgedehnten Leberschaden verursacht. Das PGI<sub>2</sub> kann den Schaden, der durch die kalte Ischämie entsteht, nicht rückgängig machen, aber lindern. Nach acht Stunden Reperfusion liegen die LDH-, ASAT-, ALAT-, GLDH- Werte und das Laktat der Reperfusatgruppe deutlich unter den Werten der Kontrollgruppe. Hier kann von einem positiven Effekt des PGI<sub>2</sub> in der Reperfusatgruppe ausgegangen werden.

Des Weiteren erscheint die Applikation von PGI<sub>2</sub> vor der kalten Ischämie deutlich effektiver zu sein und einen etwaigen circulus vitiosus bereits vor seiner Entstehung zu verhindern.

Die Gewichtszunahme und Makroskopie der Reperfusatgruppe sind der Kontrollgruppe ähnlich, was für einen ausgedehnten Ischämie/ Reperfusionsschaden nach 20 -stündiger kalter Ischämie spricht.

Nach 20 Stunden kalter Konservierung mit HTK konnte bereits in früheren Arbeiten ein schwerer Leberschaden nachgewiesen werden [35, 124].

#### **5.3.2.3. Glukose in % zur Präperfusion, Laktat**

Mit der Reperfusion und Sauerstoffzufuhr fällt das Laktat in allen Gruppen ab. Die anaerobe Glykolyse während der kalten Ischämie wird durch eine aerobe Glykolyse fortgesetzt und die mitochondriale ATP- Bildung setzt mit der Sauerstoffzufuhr wieder ein. Die Glukose wird zur Energiegewinnung verbraucht, was sich im prozentualen

Abfall der Glukose zu den Präperfusionswerten widerspiegelt. Die Glukosewerte des Gesamtorgans ähneln den Daten der Glukose, die durch die Mikrodialyse erhoben wurden. Anhand der fallenden Glukosewerte zeigt sich, dass die Leber Ihre Funktion wieder aufnimmt. Es zeigen sich bezüglich der Glukosewerte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Beurteilung der Glukosewerte hängt von der Glykolyse, Glykogenolyse, Glukoneogenese ab. Eine Differenzierung anhand der vorhandenen Daten ist nicht möglich.

Die Energiegewinnung in Form von ATP ist durch die aerobe Glykolyse (mitochondriale ATP Bildung) und Atmungskette unter Sauerstoffverbrauch effektiver. Somit erklärt sich der Laktatabfall in allen Gruppen. Bezogen auf den Vorteil der schnellen Laktatsenkung nach Beginn der Reperfusion ist eine Iloprostbehandlung zu empfehlen.

In der Spendergruppe zeigten sich zu Beginn der Reperfusion deutlich niedrigere Laktatlevel. In der HTK- und Reperfusatgruppe kommt es zu einem deutlichen Laktatabfall. In der Reperfusatgruppe könnte das kontinuierlich zugeführte PGI<sub>2</sub> zu einer verbesserten aeroben Glykolyse führen. Die Laktatparameter sind im Zusammenhang mit anderen Parametern zu sehen und dienen der Ergänzung des Gesamtbildes in der Reperfusatgruppe.

#### **5.3.2.4. Elektrolyte (Calcium, Kalium, Natrium)**

##### Calcium

Zwischen den Gruppen treten keine signifikanten Unterschiede auf. Die Calciumwerte liegen alle dicht beieinander. In allen Gruppen liegt eine Hypocalcämie vor. Der Calciumabfall kann Folge einer Calciumaufnahme durch die Zelle sein.

Ein Calciuminflux ist bei Nowak et al. [125] sowie Puhl et al. [35] beschrieben. Grund sei eine Zellschädigung und ein daraus resultierender ATPasen Ausfall. Nach Konservierung und Flushen findet sich in der Leber vor der Reperfusion ein niedriges Calcium. Konservierung und Flushen könnten Ursache sein. Man erkennt in der Reperfusion, dass das Calcium leicht fällt. In der Literatur ist für PGI<sub>2</sub> ein Calciumefflux beschrieben durch den Anstieg der intrazellulären cAMP - Konzentration. Dieser Calciumefflux soll den Schaden von Hepatozyten während und nach der Ischämie verringern [126].



In unserem Experiment liegen die Calciumwerte der Iloprost behandelten Gruppen während der Reperfusion leicht über den Werten der Kontrollgruppe, was durch einen Calciumefflux aus der Zelle bedingt sein kann und somit auf eine Protektion durch PGI<sub>2</sub> hinweist.

Zur Wertigkeit des intrazellulären Calciums im Rahmen der Zellzerstörung bestehen kontroverse Meinungen. So zeigten Baumstark et al., dass durch HTK die intrazelluläre Calciumkonzentration abfällt. Eine niedrige Temperatur, pH- und ATP-Abfall während der Hypoxie führen zur Deaktivierung von Enzymen (z.B.: Phospholipase A<sub>2</sub> und C, Endonukleasen) [127]. Andere Autoren berichten, dass durch das Calcium hydrolytische Enzyme aktiviert werden, die zum Zelltod führen [128].

Nach Gnaigner et al. und Helling et al. besteht vermutlich keine Korrelation zwischen Anstieg oder Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration und des Zellüberlebens [77, 129, 130].

Der Zusatz von Calcium zur Konservierungslösung erbringt bei Vairetti et al. jedoch eine Verbesserung im Outcome der Leber [70].

## Kalium

Die HTK - Lösung enthält KCl 9 mmol/l. Dieses Kalium entspricht dem hohen Kalium im Effluat. Kalium (kardioplege Lösung) setzt den Energieverbrauch der Zelle herab, indem das physiologische Membranpotential der Zelle durch eine Hyperkaliämie aufgehoben wird. Diese Wirkung wird bei der Konservierung ausgenutzt. Das Flushen der Leber ist wichtig, um das Kalium der Konservierungslösung zu entfernen und eine Zellfunktion zu ermöglichen.

In der Transplantationschirurgie ist das Flushen indiziert, da sonst der Empfänger einer Hyperkaliämie mit Folgen eines Herzstillstandes ausgesetzt werden würde.

Zusätzlich wird Kalium, das durch einen Zelluntergang aufgrund eines Ischämieschadens entsteht, mit dem Flushen entfernt. Die Iloprost behandelten Gruppen zeigen einen Abfall des Kaliums im Vergleich zu den Präperfusionswerten. Zellen nehmen Kalium aus dem Perfusat auf. Die Kontrollgruppe zeigt einen leichten Abfall, dann jedoch eine Kaliumkonstanz zur Präperfusion. Insgesamt finden sich keine signifikanten Unterschiede. Die leichte Hyperkaliämie in allen Gruppen besteht bereits zu Beginn der Reperfusion im Perfusat (Präperfusionswerte). Dies kann

Folge von destruierten Erythrozyten im Vollblut sein (Zelldetritus). Die Hämofiltrationslösung des Perfusats enthält 2 mmol/l Kalium, weshalb sie kein Grund für eine Hyperkaliämie darstellt.

Die niedrigsten Kalium - Werte finden sich in den Iloprost behandelten Gruppen.

### Natrium

Die Absolutwerte zeigen in allen Gruppen kaum Unterschiede zueinander, insbesondere keine signifikanten Unterschiede.

### **5.3.2.5. Mediatoren (MPO, cGMP)**

Der Ischämie/Reperfusionsschaden ist eine Folge von Veränderungen der parenchymalen (Hepatozyten) und nicht parenchymalen Zellen (Sinusendothelzellen, vaskuläre Endothelzellen, ITO-zellen). Das Zusammentreffen geschädigter Zellen mit dem Blut führt zur Freisetzung verschiedenster Mediatoren und Interaktionen mit Leukozyten, wie bereits unter 5.2.2. erwähnt.

### Die MPO (Myeloperoxidase)

Die MPO - Aktivität ist ein Maß für die Aktivität neutrophiler Granulozyten, die Merkmal einer inflammatorischen Reaktion sind [131]. In den Iloprost behandelten Gruppen zeigt sich ein Trend zu niedrigeren MPO - Werten.

Es lässt sich schlussfolgern, dass Iloprost die MPO- Aktivität einschränkt. Dies zeigten auch Clavien et al, Harada et al. sowie Della Bella et al. [55, 105,110]

In den Gruppen der Spender- und HTK- behandlung hat das Iloprost durch seine kurze Halbwertszeit keinen Einfluss mehr auf die MPO - Aktivität. Es zeigt sich jedoch die cytoprotektive Eigenschaft des PGI<sub>2</sub>s in diesen Gruppen. Vermutlich führt das Iloprost durch die Protektion von Endothelzellen und Hepatozyten zur geringeren Leukozytenadhäsion, was sich in einer geringeren MPO - Aktivität widerspiegelt. Es werden geringere Mikrozirkulationsstörungen verursacht und es resultiert ein geringerer Ischämie- Reperfusionsschaden.

Die Reperfusatgruppe zeigt die geringsten MPO- Konzentrationen nach acht Stunden Reperfusion. Die leicht niedrigeren MPO- Werte der Reperfusatgruppe nach acht Stunden Reperfusion sind erklärbar durch die kontinuierliche Zufuhr des

Iloprosts ins Reperfusionssystem, wodurch eine kontinuierliche Hemmung der Aktivierung von Leukozyten gewährleistet wird. Es bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

In der Kontrollgruppe liegen die höchsten MPO- Werte vor, was für eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion spricht. Die Ergebnisse des Experimentes unterstützen die Aussage, dass das Iloprost den MPO- Anstieg, der mit dem Ischämie/ Reperfusionsschaden auftritt, hemmt [105].

### cGMP (cyclisches GuanosinMonophosphat)

cGMP wird über den Einfluss der Guanylatzyklase aus GTP gebildet. Stimuliert wird die Guanylatzyklase durch z.B. NO. NO steigert intrazelluläres cGMP [133]. Durch NO gesteigerte intrazelluläre cGMP Level vermindern den Ischämie/ Reperfusionsschaden [134, 135].

In der HTK- Gruppe zeigen sich die höchsten cGMP- werte, die für das Leber-outcome während der Reoxygenierung effektiv sind.

Im Rahmen der Iloprostbehandlung zeigt sich bezüglich der cGMP- ergebnisse kein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich. In der vorliegenden Arbeit konnten zwar Änderungen in der cGMP Konzentration über die Zeit der Reperfusion und innerhalb der Gruppen nachgewiesen werden, diese waren jedoch nicht signifikant. Somit kann dieser Parameter nicht für eine Interpretation der anderen Ergebnisse herangezogen werden.

Die Kontrollgruppe zeigt leicht steigende Werte des cGMPs, die nach vier und acht Stunden über denen der Spender- und Reperfusatgruppe liegen. Somit scheint ein endogener Mechanismus, unabhängig von der Iloprostgabe die cGMP- Bildung zu steuern. Die Ergebnisse der Reperfusatgruppe zeigen, dass das Iloprost, nach der Ischämie gegeben, einen Effekt auf die Bildung von cGMP hat. Welchen, liefert diese Arbeit nicht.

### **5.3.3. Vergleich zwischen den Iloprost behandelten Gruppen**

Der Ischämie/ Reperfusionsschaden ist ein häufiger Grund für das primäre Versagen der Leber nach Transplantation. Hinsichtlich der hohen Anzahl Transplantatbedürftiger hat die Einschränkung des Ischämie/ Reperfusionsschadens in der Lebertransplantation hohe Priorität.

Iloprost ist eine geeignete Substanz, den Ischämie/ Reperfusionsschaden zu verringern.

Jedoch betrachteten die meisten Studien die Frage der PGI<sub>2</sub> - Behandlung einseitig. Es fand bisher der Vergleich einer PGI<sub>2</sub>- behandelten Gruppe zur nicht behandelten Gruppe (Kontrolle) statt. Richtungsweisend zeigten alle Studien, dass sich die PGI<sub>2</sub>-behandlung positiv auf das Leberoutcome auswirkt.

Ein optimales PGI<sub>2</sub> - Behandlungskonzept wurde bisher nicht beschrieben. Eine Abweichung zur einmaligen Gabe des PGI<sub>2</sub> stellt die Arbeit von Goto et al. dar. In dieser Arbeit wurden Spenderleber und Konservierungslösung mit PGI<sub>2</sub> behandelt und eine deutliche Verbesserung des Leberoutcomes nach Transplantation nachgewiesen. Ein Vergleich der Spenderbehandlung zur Konservierungslösungsbehandlung bezüglich des Leberoutcomes erfolgte nicht [118].

Die Frage, die sich bei Neumann et al. stellte, ob Prostacycline in der Konservierungslösung den gleichen vorteilhaften Effekt haben wie im Reperfusat, (oder in der Spenderbehandlung) bleibt unbeantwortet [112]. Es fehlte bisher der Vergleich zwischen zeitlich verschieden PGI<sub>2</sub> behandelten Gruppen unter denselben Versuchsbedingungen.

In dieser Arbeit ist im Gruppenvergleich zu erkennen, dass der Zeitpunkt der Iloprost- Gabe zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Es sei darauf hingewiesen, dass nur der Initialschaden betrachtet wird, da nur eine acht stündige Reperfusion vorliegt.

Die Spender- und HTK- Gruppe unterscheiden sich zur Reperfusatgruppe durch die Iloprost- Gabe kurz vor (Spendergruppe) bzw. zu Beginn (HTK-gruppe) der kalten Ischämie.

### **5.3.3.1. Makroskopie und Gewichtszunahme**

Im Vergleich der behandelten Gruppen weist die Spendergruppe die geringste Gewichtszunahme auf. Makroskopisch ist die Spendergruppe signifikant besser gegenüber der Kontrollgruppe. Alle anderen Gruppen zeigen keine Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe. Die Iloprost - Gabe in der Spendergruppe ist am effektivsten in Bezug auf die Makroskopie und Gewichtszunahme.

### **5.3.3.2. Laborparameter ASAT, ALAT, GLDH, LDH**

Gemessen an der Freisetzung von Enzymen ist die Iloprostbehandlung kurz vor bzw. zu Beginn der kalten Ischämie am zytoprotektivsten.

Die zelluläre Integrität (Hepatozytenfunktion) gemessen an den ASAT- Werten, wird durch die Iloprost- Gabe kurz vor bzw. zu Beginn der kalten Ischämie (Spender- und HTK- Gruppe) signifikant besser erhalten.

Im Iloprost- Gruppenvergleich zeigen die Spender- und Konservierungslösungsbehandlung deutlich niedrigere ASAT- Werte als die Reperfusatgruppe.

Die hohen ASAT- Werte in der Kontrollgruppe und Reperfusatgruppe sprechen für eine ausgeprägte Schädigung der Leber durch die 20 stündige kalte Ischämie.

Das Iloprost hat eine zytoprotektive Wirkung [16, 136]. In der Spendervorbereitung treten signifikant geringere LDH- Werte im Vergleich zur Reperfusatgruppe auf. Die niedrigen LDH- Werte der Spenderbehandlung sprechen für die Effektivität der Iloprost- Gabe kurz vor der kalten Ischämie und für eine zytoprotektive Eigenschaft des Iloprosts. Die LDH- Werte deuten auf eine geringere anaerobe Glykolyse in der Spendergruppe während der Reperfusion hin. Dies kann durch die schnelle Wiederaufnahme der physiologischen Energiegewinnung bedingt sein. In HTK- und Spendergruppe unterstützt das präischämisch applizierte Iloprost die Funktionswiederaufnahme der Leber während der Reperfusion.

Aufgrund der signifikant niedrigen LDH- Werte der Spendergruppe zeigt sich, dass Iloprost hier optimaler eingesetzt ist. Die Iloprostgabe vor 20 Stunden kalter Ischämie ist effektiver als in der Reperfusion.

Die Schädigung der Zellen ist nach 20 Stunden trotz Konservierung weit fortgeschritten, sodass davon auszugehen ist, dass das Iloprost in der Spendervorbereitung und HTK- Behandlung mit seiner zytoprotektiven Eigenschaft effektiver eingesetzt ist. Die signifikant höheren ASAT-, ALAT- und LDH- Werte

während der Reperfusion innerhalb jeder einzelnen Gruppe verdeutlichen die Schädigung durch die 20 stündige kalte Ischämie. Es lässt sich schlussfolgern, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen das Iloprost, wenn es kurz vor bzw. zu Beginn der kalten Ischämie gegeben wird, ein besseres Leberoutcome hervorruft als während der Reperfusion.

Der Unterschied bezüglich der LDH- Werte zwischen der Spenderbehandlung und Konservierungslösungsbehandlung ist minimal. Zwischen der Spender- u. HTK-Gruppe traten bezüglich der ASAT, ALAT, GLDH, LDH keine Signifikanzen auf. Die Spendergruppe stellt aufgrund der niedrigsten ASAT-, ALAT-, GLDH-, LDH- Werte die effektivste Iloprostbehandlung dar.

Die hohen ASAT- Werte der Reperfusatgruppe sind Folge des Ischämie/ Reperfusionsschadens nach 20 Stunden kalter Ischämie. Da der Reperfusatgruppe erst nach 20 Stunden Ischämie Iloprost zugeführt wurde, entspricht der hepatozelluläre ischämische Schaden dem der Kontrollgruppe.

### **5.3.3.3. Glukose in % zur Präperfusion, Laktat**

Bezogen auf die Glukosewerte in % zur Präperfusion erfolgte eine Diskussion unter 5.3.2.3. Zwischen den mit Iloprost behandelten Gruppen erkennt man, dass Iloprost unterschiedliche Einflüsse auf die Glukosewerte innerhalb der Reperfusion hat, ohne dass signifikante Unterschiede auftreten.

#### Laktat:

Einen deutlichen Laktatabfall während der acht Stunden Reperfusion zeigen die HTK- und die Reperfusatgruppe. Die signifikant niedrigeren Werte der Spendergruppe zu Beginn der Reperfusion deuten erneut auf einen zytoprotektiven Effekt des PGI<sub>2</sub> hin. Es ist anzunehmen, dass die Wirkung des präischämisch applizierten Iloprosts eine verbesserte Funktionswiederaufnahme während der Reperfusion unterstützt. Da das Laktat in der Reperfusatgruppe im Reperfuationsverlauf stärker fällt als in den anderen behandelten Gruppen, könnte von einem höheren Sauerstoffverbrauch in Verbindung mit einer besseren Durchblutung ausgegangen werden. In der Arbeit von Tanoa Junge ist der Gesamtfluss in der Reperfusatgruppe am besten [111].

#### **5.3.3.4. Mediatoren (MPO, cGMP)**

Abfallende cGMP- Werte in der Reperfusatgruppe zeigen einen Effekt des Iloprosts während der Reperfusion.

In den anderen behandelten Gruppen ist die Wirkung des Iloprosts durch die geringe Halbwertszeit nicht mehr vorhanden.

Zum cGMP und zur MPO erfolgte eine Diskussion unter 5.3.2.5., der hier nichts hinzuzufügen ist.

#### **5.4. Mikrodialyse**

Die Mikrodialyse dient der ergänzenden Darstellung metabolischer Veränderungen des Lebergewebes nach Explantation, während der Konservierung und Reperfusion. Sie bietet die Möglichkeit, den metabolischen Prozess in der Leber während unterschiedlicher Phasen in der Transplantation zu verfolgen [35].

In unserem Experiment dient sie der Analyse von Glukose-, Laktat-, Pyruvat- und Glycerinkonzentrationen in den ersten sechs Stunden der Ischämie sowie an deren Ende (20h) und der ergänzenden Darstellung des Leberoutcomes in der Reperfusionszeit. Dabei wird nur der Initialschaden in den ersten acht Stunden Reperfusion betrachtet. Daten zur Reperfusatgruppe liegen nicht vor, da die Mikrodialyse als Verfahren erst zu einem späteren Zeitpunkt in das Experiment integriert wurde. Mikrodialyseverfahren ermöglichen den unmittelbaren Zugang zur interstitiellen Flüssigkeit. Für die Substrate Glukose, Laktat, Pyruvat, die den Carbohydrate Stoffwechsel widerspiegeln [125, 137], und Glycerin ist eine Bestimmung des Umsatzes leicht. Sie sind Parameter der ischämischen Schädigung. Allein die kalte Konservierung führt zum Abfall metabolischer/glykolytischer Aktivität, die anhand der Mikrodialyse messbar ist. Den gesamten Zustand der Leber spiegelt die Mikrodialyse nicht wider, da nur eine Geweberegion beurteilt wird. Dennoch zeigten Haugaa et al., dass die Mikrodialysergebnisse von rechtem und linkem Leberlappen keine signifikanten Unterschiede zeigten [138]. Die Mikrodialyse ist eine Möglichkeit zur kontinuierlichen Darstellung des Gewebemetabolismus und zur frühen Detektion von Gewebeveränderungen, die oft erst post transplantationem anhand der Transaminasen erkannt werden [125, 137].

Nach einer Lebertransplantation kann das intrahepatische Monitoring per Mikrodialyse zum Schutz des Transplantats und somit des Empfängers dienen, da frühzeitig eine Ischämie und Abstoßung durch die Mikrodialyse detektiert werden kann[139].

### Glukose

Während der kalten Ischämie wird über die anaerobe Glykolyse Laktat gebildet. Der abfallende pH (durch das ansteigende Laktat) führt zur Hemmung der Glykolyse. Nowak et al. beschrieben einen Glukoseanstieg während der Ischämiezeit und deuteten dies als eine leberspezifische Reaktion auf den durch Ischämie resultierenden erhöhten Energiebedarf [125]. Glukose könnte durch die Glykogenolyse in der Leber entstehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diesen Anstieg der Glukosewerte in den ersten vier Stunden der kalten Ischämie.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede innerhalb der Kontrollgruppe und innerhalb der HTK- Gruppe. In der Kontrollgruppe lagen die Glukosewerte nach drei Stunden Ischämie signifikant über denen nach einer Stunde Ischämie. Iloprost- behandelte Gruppen zeigen geringere Glukosekonzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit zur Ischämiezeit. Die Spendervorbereitung hat die geringsten Glukosewerte. Die Beurteilung der Glukosewerte hängt von der Glykolyse, Glykogenolyse, Glukoneogenese ab. Eine genaue Differenzierung anhand der vorhandenen Daten ist nicht möglich.

In allen Gruppen zeigt sich die Wiederaufnahme der Leberfunktion durch die wieder niedrigeren Werte während der Reperfusion. Zwischen den einzelnen Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede während der kalten Ischämie und der Reperfusion. Das Abfallen der Glukosewerte deckt sich mit den Daten von Nowak [125] und verdeutlicht die Wiederaufnahme der Leberfunktion. Interessant ist, dass die Iloprostbehandlung kurz vor der Ischämie (Spendergruppe) sich scheinbar anders auswirkt als zu Beginn der kalten Ischämie (HTK-gruppe). Die Glukosewerte in der Spendergruppe sind während der kalten Ischämie am niedrigsten. Da jedoch keine Signifikanzen vorliegen, kann über eine Protektion durch die Iloprostgabe kurz vor der kalten Ischämie nur spekuliert werden.



## Glycerin

Als Bestandteil von Zellmembranen führt eine Zellmembranzerstörung zur Freisetzung von Glycerin. Die Glycerinwerte gelten als Marker eines Zellschadens [125, 140, 141]. Bei erhöhtem Energiebedarf werden Triacylglycerole abgebaut. Hillered et al. und Nowak et al. fanden steigende Glycerolwerte im Zusammenhang mit einem ischämischen Schaden. Die Glycerinergebnisse in dieser Arbeit deuten auf eine starke ischämische Schädigung in der Kontrollgruppe hin.

Mit Hilfe der Mikrodialyse fand sich bei Schweinelebern ein signifikant höherer Glycerollevel in der HTK- konservierten Gruppe verglichen mit der UW- konservierten Gruppe nach 12 und 18 Stunden kalter Ischämie [35]. Nach 24 Stunden kalter Ischämie zeigte sich kein Unterschied mehr, wobei die Autoren vor einer Interpretation der Werte ab 18 h warnen, da die oberen Grenzwerte des Messbereichs bereits überschritten waren. Hier wird eine geringere Effektivität der HTK- Lösung ab der 12. Stunde kalter Ischämie beschrieben [35].

In der vorliegenden Arbeit zeigen sich während der Ischämiezeit in der Kontrollgruppe deutlich höhere Werte zu allen behandelten Gruppen. Innerhalb der behandelten Gruppen zeigt die HTK – Gruppe ab der dritten Ischämiestunde permanent höhere Werte zur Spendergruppe. Der Zeitpunkt der Iloprost- Gabe bedingt eine veränderte Glycerinfreisetzung. Die signifikant niedrigeren Glycerinwerte gegenüber der Kontrollgruppe deuten auf eine ausgeprägt zytoprotektive Wirkung des Iloprosts in der Spendergruppe hin. Iloprost kann somit einem Zellschaden durch die kalte Ischämie entgegenwirken. Die Iloprost- Gabe kurz vor der Konservierung (Spender-behandlung) ist effektiv und scheint in Hinsicht auf die Glycerinwerte die effektivste Behandlung zu sein.

Die hohen Glycerinwerte in der HTK- Gruppe deuten auf eine geringere Effektivität der Iloprostbehandlung in der Konservierungslösung hin.

Die signifikanten Unterschiede innerhalb jeder einzelnen Gruppe verdeutlichen jedoch, dass ein Zellschaden durch die 20 Stunden kalte Ischämie nicht abzuwenden ist.

Eine Erklärung zum allgemeinen Anstieg der Glycerinwerte während der kalten Ischämie geht von der Aktivierung der Phospholipasen aus. Aufgrund des Energieverlustes/der Ischämie (mit folgendem ATPasen Ausfall) kommt es zu einem Calciumeinstrom in die Zelle [142]. Das Calcium aktiviert Phospholipasen. Phospholipasen spalten das Glycerol der Zellmembranphospholipide ab. Das

Glycerol kann im interstitiellen Raum gemessen werden [125, 141]. Zur Bedeutung des Calciums erfolgte bereits eine Diskussion unter 5.3.2.4.

Während der Reperfusion liegen die Glycerolwerte deutlich (30 - 100 fach) bis signifikant unter den Glycerolwerten der kalten Ischämie. Mit der Sauerstoffzufuhr wurde der ischämische Zustand aufgehoben. Die Energiegewinnung erfolgt physiologisch. Die Zellschädigung ist reduziert. Die signifikant niedrigeren Werte innerhalb der einzelnen Gruppen während der Reperfusion weisen auf eine geringere Zellschädigung hin.

Das Flushen selbst nach kalter Ischämie und die Reperfusion allein können Ursache des starken Glycerolabfalls in allen Gruppen sein, da durch sie ein Abtransport des sich im Interstitium angestauten Glycerols gewährleistet wird.

### Laktat und Pyruvat

Zur Beurteilung der Zellischämie bzw. inadäquaten Sauerstoffversorgung sind der Anstieg des Laktats und die Laktat/Pyruvat - Ratio als aussagekräftig beschrieben [125, 141].

Während der anaeroben Glykolyse wird aus Pyruvat Laktat gebildet. Metabolische Veränderungen durch Ischämie sind gekennzeichnet durch den Anstieg des Laktats und Abfall des Pyruvats. Bei vermehrter anaerober Glykolyse während der kalten Ischämie fällt das Pyruvat in allen Gruppen zugunsten des gebildeten Laktats ab. Die anaerobe Glykolyse stellt den Energielieferanten während der Ischämie dar. Der Anstieg der Laktat/Pyruvat - Ratio, besonders in der HTK- Gruppe in den ersten zwei Stunden der kalten Ischämie spiegelt die anaerobe Energiegewinnung wider. Kommt es durch die niedrige Temperatur zu einer Enzymaktivitätsminderung, in dem Falle der LDH, wird weniger Laktat gebildet. Der Laktatanstieg stellt einen Indikator für die Ischämie und anaerobe Glykolyse dar [125]. In der vorliegenden Arbeit zeigen sich ebenso ein Laktatanstieg, signifikant innerhalb der HTK- Gruppe und ein Laktatabfall ab der vierten bzw. sechsten Stunde bis zur 20. Stunde, was für eine Enzymaktivitätsminderung spricht.

Die Laktat/Pyruvat- Ratio unterliegt in der Spendergruppe über die Ischämiezeit keinen starken Schwankungen. In der HTK- Gruppe deutet der Laktat/Pyruvat- anstieg auf eine deutliche anaerobe Glykolyse bei erhöhtem Energiebedarf hin. Die Laktat/Pyruvat- Ratio zeigt ab der eineinhalben Stunde einen deutlichen Abfall in der

HTK- Gruppe, obwohl das Laktat weiterhin kontinuierlich bis zur sechsten Stunde steigt, bei nicht schwankenden Pyruvatwerten.

Es ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse erhebliche Standardabweichungen zeigen. Der deutliche Abfall der Laktat/Pyruvat- Ratio während der Reperfusion spricht für die Wiederaufnahme der aeroben Glykolyse. Ein deutlicher Abfall der Laktat/Pyruvat- Ratio ist bei Nowak et al. während der Reperfusion beschrieben[125]. Die Laktat/Pyruvat- Ratio sinkt ebenso in unserem Experiment.

In unserem Experiment ist ein deutlicher Pyruvatanstieg bis zur zweiten Stunde Reperfusion zu erkennen mit einem folgenden Pyruvatabfall.

Mit Beginn der Sauerstoffzufuhr erfolgt die ATP- Bildung über die Atmungskette. Das Pyruvat wird dem Citratzyklus zugeführt. Dies ist in allen Gruppen erkennbar, zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede. Das Iloprost, was präischämisch injiziert wurde, wirkt aufgrund seiner geringen Halbwertszeit nicht während der gesamten Reperfusion. Die Spenderbehandlung grenzt sich mit den niedrigen Laktatwerten in der Ischämie und den signifikant niedrigen Werten in der Reperfusion (zweite Stunde) zur Kontrollgruppe ab. In der HTK- Gruppe zeigen die signifikant höheren Laktat- Werte der fünften und sechsten Ischämie- Stunde, dass die anaerobe Glykolyse hier einen Höhepunkt erreicht. Puhl et al. beschrieben, dass das Laktat nach sechs Stunden Ischämie ein steady state erreicht, was Folge der Enzymaktivitätsminderung durch die Temperatur von 4°C ist [35]. In der vorliegenden Arbeit konnte kein steady state gezeigt werden, jedoch ein Abfall der Laktatwerte bis zur 20. Stunde ab der vierten/ fünften Stunde in Iloprostgruppen und nach der sechsten Stunde in der Kontrollgruppe.

## **5.5. Ideen zur unterschiedlichen Iloprostwirkung in den einzelnen Gruppen**

Die Spendergruppe zeigt im Vergleich aller Gruppen die niedrigsten ASAT-, ALAT-, LDH- Werte. In der Spendergruppe zeigt sich eine deutlich geringere Gewichtszunahme. Die per Mikrodialyse gemessene Glycerinkonzentration während der kalten Ischämie ist in der Spendergruppe am niedrigsten, signifikant niedriger zur Kontrollgruppe.

Iloprost hat eine zytoprotektive Wirkung in Spender- und HTK- Gruppe. Die Reperfusatgruppe profitiert von der Wirkung des Iloprosts, was sich im Vergleich zur Kontrollgruppe an den ALAT-, ASAT-, LDH-, GLDH-, Laktat- Werten zeigt.

Vergleicht man die Spendervorbehandlung mit der Konservierungslösungsbehandlung, so trat ein deutlicher Unterschied bezüglich des in der Mikrodialyse gemessenen Glycerins ab der dritten Stunde kalter Ischämie auf. In der Betrachtung aller Parameter stellt sich die Spenderbehandlung als effektivste Behandlung dar. Die Glycerinparameter ordnen sich hier in ein bestehendes Bild ein.

Ein Grund für die Effektivität der Spenderbehandlung kann der zeitliche Vorlauf der Iloprostgabe zur Konservierung sein.

Da in der Spendergruppe die Iloprost- Gabe zeitlich vor der Konservierung erfolgt, kann der vasodilatatorische, aggregationshemmende Effekt des Iloprosts zu einem verbesserten Konservierungslösungsfluss führen. Der verbesserte Konservierungslösungsfluss hat eine höhere Angriffsfläche und erfasst eine größere Zellzahl, die konserviert wird. Die Äquilibration wird verbessert.

Schlussfolgernd resultiert aus dem zeitlichen Vorlauf des Iloprosts zur Konservierung eine bessere Konservierung der Leber in der Spendergruppe.

Die erhobenen Ergebnisse zeigen den deutlichen Vorteil der Spenderbehandlung. Der intrahepatische Konservierungslösungsfluss wurde in dieser Arbeit nicht gemessen und die intraoperative Durchblutung der Leber nicht quantitativ erfasst. Die annähernd konstanten cGMP- Werte innerhalb der Spendergruppe könnten auf die gute Konservierung und zytoprotektive Wirkung des Iloprosts zurückgeführt werden.

Die cGMP- Werte bleiben annähernd gleich und liegen nach der achten Stunde unter den Werten der Reperfusionatgruppe, was für die Effektivität der Spenderbehandlung spricht.

In der HTK- Gruppe hat das Iloprost keinen Vorlauf zur Konservierungslösungseinleitung. Dies könnte ein Grund für die in der Mikrodialyse gemessenen hohen Glycerinwerte in der HTK- Gruppe sein, die ab der dritten bis zur fünften Stunde signifikant höher liegen. In der HTK- Gruppe wird vermutlich ein geringerer Teil der Leberzellen durch die Konservierungslösung erreicht, da das Iloprost zeitlich erst mit der Konservierungslösung vasodilatatorisch und Thrombozyten aggregationshemmend wirkt.

Jedoch wirkt sich der zytoprotektive Effekt des Iloprosts auch in der HTK- Gruppe positiv aus, was an den Reperfusionsergebnissen nach 20 Stunden kalter Ischämie erkennbar ist.

Vermutlich wird durch die hepatozellulär zytoprotektive Wirkung [16] und den vasodilatatorischen, aggregationshemmenden Effekt des Iloprosts in beiden Gruppen die Zellprotektion und Zellkonservierung verbessert.

Die per Mikrodialyse gemessenen Laktatparameter in der Spendergruppe und HTK-Gruppe zeigen im Vergleich zur Reperfusatgruppe, dass das Iloprost die Leberschädigung während der kalten Ischämie einschränkt und den Ischämie/ Reperfusionsschaden vermindert.

Iloprost trifft in der Reperfusatgruppe auf einen Zellzustand nach 20 Stunden kalter Ischämie. Vergleicht man die Ergebnisse der Reperfusatgruppe mit der Kontrollgruppe ist die Iloprost- Gabe auch nach 20 Stunden kalter Ischämie als positiv für das Leberoutcome anzusehen.

Im Gruppenvergleich der Iloprost behandelten Gruppen wurde gezeigt, dass der Zeitpunkt der Iloprost- Gabe zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.

In der Spender- und HTK- Gruppe konnte nach 20 Stunden kalter Ischämie die Zellintegrität aufrechterhalten werden. Die Transaminasenhöhe der Reperfusatgruppe ist der der Kontrollgruppe ähnlich. Es ist von einem hepatozellulären und Endothelzellschaden durch die 20 Stunden kalte Ischämie auszugehen.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die generelle Iloprostgabe empfehlenswert ist.

## 6. Zusammenfassung

Die guten Ergebnisse haben zu einer Ausweitung der Indikationen zur Lebertransplantation geführt. Der somit steigende Bedarf an Spenderorganen, bei derzeit abfallender Spendebereitschaft führte zu einer Zunahme an Transplantationen von sog. ‚marginalen Organen‘.

Marginale Organe zeigen eine höhere Rate an Nicht- bzw. Malfunktion und ein insgesamt schlechteres Outcome. Marginale Organe sind empfindlicher gegenüber dem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Iloprost kann zur Verbesserung des Leberoutcomes von Marginalorganen im Rahmen der Transplantation beitragen.

Existierende Untersuchungen zeigen einen positiven Effekt von Iloprost auf das Leberoutcome. Mit seiner zytoprotektiven, vasodilatatorischen, Thrombozytenaggregations hemmenden Wirkung führt es zur Verbesserung des Leberoutcomes.

In den bisher durchgeführten Untersuchungen zu Iloprost und Leberoutcome fehlt bisher der Vergleich zwischen zeitlich verschieden Iloprost behandelten Lebern unter denselben Versuchsbedingungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Schweinelebern explantiert, 20 Stunden in HTK (4°) kalt konserviert, geflushed und in einem etablierten extrakorporalem Perfusionsmodell mit Schweinevollblut acht Stunden (re-)perfundiert.

Das Iloprost wurde immer in der gleichen Konzentration, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, verabreicht. Es wurden vier Gruppen à sieben Lebern untersucht.

Die Kontrollgruppe stellt die Nichtbehandlung dar.

Die Iloprostbehandlung erfolgte durch die Applikation in die Spenderaorta kurz vor der Konservierung (Spendergruppe), durch Zugabe in die Konservierungs (HTK)-lösung (HTK- Gruppe) oder durch die Behandlung des Reperfusats (Reperfusatgruppe) nach 20 Stunden kalter Ischämie während der extracorporalen (Re-)perfusion.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die Spendergruppe signifikant bessere makroskopische Ergebnisse nach vier und acht Stunden Reperfusion und eine signifikant geringere prozentuale Gewichtszunahme zum Ausgangsgewicht. Des Weiteren ergaben sich signifikant niedrigere ASAT- und LDH- Werte in der Spendergruppe nach vier, sechs und acht Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Mikrodialysedaten zeigen, dass die Glycerinwerte der Spendergruppe während der kalten Ischämie signifikant unter denen der Kontrollgruppe liegen nach drei, vier,

fünf und sechs Stunden. Die Laktatwerte liegen ebenso signifikant unter denen der Kontrollgruppe nach zwei Stunden Reperfusion.

Die HTK- Gruppe zeigte ebenso signifikant niedrigere ASAT- und LDH- werte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach vier, sechs und acht Stunden.

Iloprost, gegeben vor bzw. zu Beginn der kalten Konservierung, hat einen signifikant positiven Effekt auf das Leberoutcome.

Vergleicht man die vor der kalten Ischämie behandelten Gruppen (Spender- und HTK- Gruppe) zur Reperfusatgruppe, so zeigt sich, dass die Spendergruppe signifikant niedrigere ASAT- Werte nach vier Stunden Reperfusion hat und die Spender- und HTK- Gruppe signifikant niedrigere LDH- Werte im Vergleich zur Reperfusatgruppe nach einer halben, vier, acht Stunden Reperfusion haben. Schlussfolgernd ist die Iloprostgabe vor der kalten Ischämie effektiver.

In der Reperfusatgruppe entspricht der hepatozelluläre Schaden durch die Ischämie dem hepatozellulären Schaden der Kontrollgruppe. Die hohen Transaminasewerte in der Reperfusatgruppe sind Ausdruck eines ausgedehnten Leberschadens.

Die Spendergruppe hat signifikant niedrigere Laktatwerte zur HTK- und Reperfusatgruppe nach einer halben Stunde Reperfusion.

Innerhalb der HTK- Gruppe zeigen die signifikant hohen Glycerinwerte der kalten Ischämie nach der dritten bis sechsten Stunde im Vergleich zur halben Stunde, dass es zu einer signifikanten Schädigung gekommen ist. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigen sich während der kalten Ischämie ebenso signifikante Unterschiede der Glycerinwerte, die für eine Schädigung sprechen.

Nach 20 Stunden kalter Konservierung von Schweinelebern konnte in einem extrakorporalen Perfusionskreislauf eine Verbesserung des Leberoutcomes (im Sinne eines reduzierten Ischämie-Reperfusionsschaden) durch die Gabe von Iloprost gezeigt werden. Betrachtet man die Gesamtheit aller Ergebnisse, sind die Iloprostwirkungen in der Spendergruppe am effektivsten. Die Konservierungslösungsbehandlung ist ebenso effektiv und kann bei Kontraindikationen zur Spenderbehandlung durchgeführt werden.

Mit Iloprost ist eine Substanz gefunden, durch die sich mit der Gabe zum richtigen Zeitpunkt marginale Organe effektiv behandeln lassen und ein deutlich besseres Outcome gegenüber nicht behandelten marginalen Organen erzielen lässt. Hierdurch könnte sich eine sicherere Verwendung marginaler Organe auch klinisch erreichen lassen und in weiterer Konsequenz eine Erweiterung des Organpools ergeben.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Neuhaus, P.P., R., *Aktuelle Aspekte der Lebertransplantation, 2. Auflage*. UNIMED-Science, 2005.
2. Busuttil, R.W. and K. Tanaka, *The utility of marginal donors in liver transplantation*. Liver Transpl, 2003. **9**(7): p. 651-63.
3. Bundesärztekammer, *Richtlinien zur Organtransplantation nach § 16 TPG, Änderung*. Deutsches Ärzteblatt, 2004. **101**((A)): p. 246-247.
4. Gastaca, M., *Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient*. Transplant Proc, 2009. **41**(3): p. 975-9.
5. Walcher, F., I. Marzi, and V. Buhren, *Liver preservation in UW and HTK solution: the influence on sinusoidal perfusion after liver transplantation*. Transplant Proc, 1991. **23**(5): p. 2376-7.
6. Erhard, J., et al., *Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study*. Transpl Int, 1994. **7**(3): p. 177-81.
7. Pokorny, H., et al., *Preservation of the liver: is it possible to extend the time of storage?* Transplant Proc, 1999. **31**(5): p. 2074-6.
8. Tolba, R.H., et al., *Experimental liver preservation with Celsior: a novel alternative to University of Wisconsin and histidine-tryptophan-alpha-ketoglutarate solutions?* Eur Surg Res, 2000. **32**(3): p. 142-7.
9. Kukan, M. and P.S. Haddad, *Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts*. Liver Transpl, 2001. **7**(5): p. 381-400.
10. Ärztekammer, B., *Richtlinien zur Organtransplantation*. Deutsches Ärzteblatt, 2011. **108**(12): p. A:662/ B-538/ C-538.
11. Reinhardt, N., *Onkologische Lebertransplantation am Universitätsklinikum der Universität zu Köln - Ergebnisse der ersten 10 Jahre*. DISSERTATION Universität Köln, Köln, Deutschland, 2009.
12. Dabbert, S., *Langzeitergebnisse und Erfahrungen nach Lebertransplantation an der Charité-CVK*. DISSERTATION, Charité CVK, Berlin, Deutschland, 2011.
13. Sindram, D., et al., *Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism*. J Hepatol, 2002. **36**(1): p. 78-84.



14. Puhl, G.T., S.; Settmacher, U.; Neuhaus, P., *Die Protektion der Leber vor Schädigung durch Ischämie/Reperfusion - therapeutische Ansätze und klinische Erfahrungen*. TransplantLinc 2005. **Heft 10**.
15. Grant, S.M. and K.L. Goa, *Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures*. Drugs, 1992. **43**(6): p. 889-924.
16. Araki, H. and A.M. Lefer, *Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver*. Am J Physiol, 1980. **238**(2): p. H176-81.
17. von Engelhardt, W., *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, 2. Auflage.
18. Wolf, S., et al., *Effects of epoprostenol and norepinephrine on hemodynamics of the isolated perfused liver*. Transplant Proc, 1998. **30**(5): p. 2334-5.
19. Adham, M., et al., *The isolated perfused porcine liver: assessment of viability during and after six hours of perfusion*. Transpl Int, 1997. **10**(4): p. 299-311.
20. Bell, R., et al., *The evaluation of the isolated perfused liver as a model for the assessment of liver preservation*. Aust N Z J Surg, 1993. **63**(1): p. 44-52.
21. Neuhaus, P. and G. Blumhardt, *Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver*. Int J Artif Organs, 1993. **16**(10): p. 729-39.
22. Yanaga, K., et al., *A new liver perfusion and preservation system for transplantation research in large animals*. J Invest Surg, 1990. **3**(1): p. 65-75.
23. Vane, J.R. and R.M. Botting, *Pharmacodynamic profile of prostacyclin*. Am J Cardiol, 1995. **75**(3): p. 3A-10A.
24. Moncada, S., et al., *An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation*. Nature, 1976. **263**(5579): p. 663-5.
25. Klotz, E., *Der Einfluss des stabilen Prostazyklinanalogons Iloprost auf immunologische Parameter im Rahmen der kontinuierlichen veno-venösen Hämofiltration*. DISSERTATION Charité , CVK, Berlin, Deutschland, 2011.
26. Mutschler, E.G., G. Kroeker, H.K., *Mutschler Arzneimittelwirkungen 8. Auflage*. 2001.
27. Whittaker, N., et al., *The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin)*. Prostaglandins, 1976. **12**(6): p. 915-28.
28. Higgs, E.A., et al., *Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) inhibits the formation of platelet thrombi in arterioles and venules of the hamster cheek pouch*. Br J Pharmacol, 1978. **63**(3): p. 535-9.

29. Heise, M., et al., *Correlation between angiographic runoff and intraoperative hydraulic impedance with regard to graft patency*. Ann Vasc Surg, 2003. **17**(5): p. 509-15.
30. Heise, M., et al., *A new method of intraoperative hydraulic impedance measurement provides valuable prognostic information about infrainguinal graft patency*. J Vasc Surg, 1999. **30**(2): p. 301-8.
31. Coym, A., *Regulation der Endothelfunktion durch das leukozytäre Hämprotein Myeloperoxidase*. DISSERTATION Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Deutschland, 2011.
32. Vachenauer, *Reduktion des Reperfusionsschadens am Schweineherz durch retrograd koronar-venöse Transfektion mit VEGF*. DISSERTATION LMU-München, München, Deutschland, 2009.
33. Abrahamson, P., *Methodical aspects on microdialysis sampling and measurements*. DISSERTATION, Umea University, Umea, Sweden, 2010.
34. Löffler, P., *Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage*. 2003.
35. Puhl, G., et al., *24-h storage of pig livers in UW, HTK, hydroxyethyl starch, and saline solution: is microdialysis an appropriate method for the continuous graft monitoring during preservation?* Transpl Int, 2006. **19**(4): p. 303-9.
36. Abouna, G.M., *Simultaneous liver hemoperfusion and hemodialysis for treatment of hepatic coma and hepatorenal failure*. Surgery, 1973. **73**(4): p. 541-9.
37. Chari, R.S., et al., *Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(4): p. 234-7.
38. Eiseman, B., D.S. Liem, and F. Raffucci, *Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure*. Ann Surg, 1965. **162**(3): p. 329-45.
39. Gubernatis, G., et al., *HTK-solution (Bretschneider) for human liver transplantation. First clinical experiences*. Langenbecks Arch Chir, 1990. **375**(2): p. 66-70.
40. Hatano, E., et al., *Hepatic preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in living-related and cadaveric liver transplantation*. Clin Sci (Lond), 1997. **93**(1): p. 81-8.
41. Muhlbacher, F., F. Langer, and C. Mittermayer, *Preservation solutions for transplantation*. Transplant Proc, 1999. **31**(5): p. 2069-70.
42. Testa, G., et al., *Histidine-tryptophan-ketoglutarate versus University of Wisconsin solution in living donor liver transplantation: results of a prospective study*. Liver Transpl, 2003. **9**(8): p. 822-6.

43. Funke, C.B., *Restitution warm ischämisch vorgeschädigter Schweineherzen nach verschiedenen Konservierungsverfahren und orthotoper Transplantation*. DISSERTATION Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland, 2001.
44. Lamesch, P., et al., [*In situ protection of the liver with Bretschneider HTK solution*]. *Langenbecks Arch Chir*, 1991. **376**(2): p. 85-92.
45. Upadhyya, G.A. and S.M. Strasberg, *Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions*. *Hepatology*, 2000. **31**(5): p. 1115-22.
46. Southard, J.H. and F.O. Belzer, *Organ preservation*. *Annu Rev Med*, 1995. **46**: p. 235-47.
47. van Gulik, T.M., et al., *Preservation of canine liver grafts using HTK solution*. *Transplantation*, 1994. **57**(2): p. 167-71.
48. Haller, G.W., et al., *Factors relevant to the development of primary dysfunction in liver allografts*. *Transplant Proc*, 1995. **27**(1): p. 1192.
49. Schon, M.R., et al., *Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion*. *Ann Surg*, 2001. **233**(1): p. 114-23.
50. Tolboom, H., et al., *Sequential cold storage and normothermic perfusion of the ischemic rat liver*. *Transplant Proc*, 2008. **40**(5): p. 1306-9.
51. Tolboom, H., et al., *Recovery of warm ischemic rat liver grafts by normothermic extracorporeal perfusion*. *Transplantation*, 2009. **87**(2): p. 170-7.
52. Gong, J., et al., *Preservation of non-heart-beating donor livers in extracorporeal liver perfusion and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(15): p. 2338-42.
53. Leff, J.A. and J.E. Repine, *Blood cells and ischemia-reperfusion injury*. *Blood Cells*, 1990. **16**(1): p. 183-91; discussion 191-2.
54. Clavien, P.A., et al., *Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects*. *Hepatology*, 1993. **17**(1): p. 131-42.
55. Clavien, P.A., P.R. Harvey, and S.M. Strasberg, *Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies*. *Transplantation*, 1992. **53**(5): p. 957-78.
56. Cywes, R., et al., *Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat*. *Hepatology*, 1993. **18**(3): p. 635-47.

57. Sindram, D., et al., *Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver*. Gastroenterology, 2000. **118**(1): p. 183-91.
58. Kraft, W.D., U.M., *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin 6. Auflage*. 2005.
59. Puhl, G., *Verbesserung der Funktions- und Reduktion der Schädigungsparameter nach warmer Ischämie der Schweineleber durch isolierte extrakorporale Leberperfusion und simultane Perfusatdialyse*. DISSERTATION Charité , CVK, Berlin, Deutschland, 2001.
60. Gleeson, D., J.G. Corasanti, and J.L. Boyer, *Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes. II. Modulation of intracellular pH*. Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 1): p. G299-307.
61. Pfeffer, J., *Die isoliert autolog hämoperfundierte Schweineleber: Effekte von Polidocanol und Diclofenac*. DISSERTATION FU-Berlin, Berlin, Deutschland, 2002.
62. Gemmell, C.H., *Activation of platelets by in vitro whole blood contact with materials: increases in microparticle, procoagulant activity, and soluble P-selectin blood levels*. J Biomater Sci Polym Ed, 2001. **12**(8): p. 933-43.
63. Heijnen, B.H., et al., *Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs*. Surgery, 2003. **134**(5): p. 806-17.
64. Biberthaler, P., et al., *The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis*. Transplantation, 2001. **72**(9): p. 1486-90.
65. Abouna, G.M., *Pig liver perfusion with human blood. The effect of preparing and flushing the liver with various balanced solutions on its subsequent viability and function*. Br J Surg, 1968. **55**(10): p. 761-8.
66. Drapanas, T., R. Zemel, and J.O. Vang, *Hemodynamics of the isolated perfused pig liver: metabolism according to routes of perfusion and rates of flow*. Ann Surg, 1966. **164**(3): p. 522-37.
67. Ikeda, T., et al., *Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 454-61.
68. Brettschneider, L., et al., *The Use of Combined Preservation Techniques for Extended Storage of Orthotopic Liver Homografts*. Surg Gynecol Obstet, 1968. **126**(2): p. 263-274.

69. Saad, S. and T. Minor, *Short-term resuscitation of predamaged donor livers by brief machine perfusion: the influence of temperature*. *Transplant Proc*, 2008. **40**(10): p. 3321-6.
70. Vairetti, M., et al., *Correlation between the liver temperature employed during machine perfusion and reperfusion damage: role of Ca<sup>2+</sup>*. *Liver Transpl*, 2008. **14**(4): p. 494-503.
71. Hellinger, A., et al., *Preservation of pig liver allografts after warm ischemia: normothermic perfusion versus cold storage*. *Langenbecks Arch Chir*, 1997. **382**(4): p. 175-84.
72. Huguet, C., A. Gavelli, and S. Bona, *Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour*. *J Am Coll Surg*, 1994. **178**(5): p. 454-8.
73. Koizumi, M., et al., *Preservation and reflow damage in liver transplantation in the pig*. *Transplant Proc*, 1989. **21**(1 Pt 2): p. 1323-6.
74. Teoh, N.C. and G.C. Farrell, *Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **18**(8): p. 891-902.
75. Riede, U.N.S., H.E., *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2001.
76. Jaeschke, H. and J.J. Lemasters, *Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(4): p. 1246-57.
77. Gnaiger, E., et al., *Mitochondrial defect in endothelial cold ischemia/reperfusion injury*. *Transplant Proc*, 1999. **31**(1-2): p. 994-5.
78. Mitchell, S.J., et al., *Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver*. *Cryobiology*, 1999. **39**(2): p. 130-7.
79. Caldwell-Kenkel, J.C., et al., *Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion*. *Hepatology*, 1991. **13**(1): p. 83-95.
80. Pascher, A., et al., *Extracorporeal liver perfusion as hepatic assist in acute liver failure: a review of world experience*. *Xenotransplantation*, 2002. **9**(5): p. 309-24.
81. Borie, D.C., et al., *Functional metabolic characteristics of intact pig livers during prolonged extracorporeal perfusion: potential for a unique biological liver-assist device*. *Transplantation*, 2001. **72**(3): p. 393-405.
82. D'Silva, J.L. and M.W. Neil, *The potassium water and glycogen contents of the perfused rat liver*. *J Physiol*, 1954. **124**(3): p. 515-27.
83. Fondevila, C., et al., *Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion*. *Ann Surg*, 2011. **254**(6): p. 1000-7.

84. Foley, D.P., et al., *Biliary secretion of extracorporeal porcine livers with single and dual vessel perfusion*. *Transplantation*, 1999. **68**(3): p. 362-8.
85. Gaber, A.O., et al., *Improved results of preservation of hepatic grafts preflushed with albumin and prostaglandins*. *Transplant Proc*, 1988. **20**(5): p. 992-3.
86. Abdennebi, H.B., et al., *Evaluation of parenchymal and nonparenchymal cell injury after different conditions of storage and reperfusion*. *Transpl Int*, 1998. **11**(5): p. 365-72.
87. Yadav, S.S., et al., *Comparison of techniques for rapid cooling of organs in a non-heart-beating porcine model*. *Transplant Proc*, 1997. **29**(8): p. 3557-8.
88. Lemasters, J.J. and R.G. Thurman, *Reperfusion injury after liver preservation for transplantation*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. **37**: p. 327-38.
89. van Wagenveld, B.A., et al., *Warm flush at 37 degrees C following cold storage attenuates reperfusion injury in preserved rat livers*. *Transpl Int*, 1998. **11**(1): p. 38-45.
90. Fondevila, C., R.W. Busuttil, and J.W. Kupiec-Weglinski, *Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look*. *Exp Mol Pathol*, 2003. **74**(2): p. 86-93.
91. Dogan, S. and M. Aslan, *Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage*. *Hepatol Res*, 2011. **41**(2): p. 103-17.
92. Teoh, N.C., *Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. 180-7.
93. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. 173-9.
94. Jaeschke, H., *Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(6): p. G1083-8.
95. Jaeschke, H. and T. Hasegawa, *Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury*. *Liver Int*, 2006. **26**(8): p. 912-9.
96. Vollmar, B., et al., *Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence*. *Surgery*, 1995. **117**(2): p. 195-200.
97. Khandoga, A., et al., *Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo*. *Transplantation*, 2002. **74**(5): p. 681-8.

98. Eberl, T., et al., *Expression of stress proteins, adhesion molecules, and interleukin-8 in endothelial cells after preservation and reoxygenation*. Cryobiology, 1999. **38**(2): p. 106-18.
99. Nakano, H., et al., *Efficacy of intraportal injection of anti-ICAM-1 monoclonal antibody against liver cell injury following warm ischemia in the rat*. Am J Surg, 1995. **170**(1): p. 64-6.
100. Kohli, V., et al., *Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver*. Transplantation, 1999. **67**(8): p. 1099-105.
101. Natori, S., et al., *Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism*. Transplantation, 1999. **68**(1): p. 89-96.
102. Harrison, D.C., J.J. Lemasters, and B. Herman, *A pH-dependent phospholipase A2 contributes to loss of plasma membrane integrity during chemical hypoxia in rat hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **174**(2): p. 654-9.
103. Caldwell-Kenkel, J.C., et al., *Reperfusion injury to endothelial cells after cold storage of rat livers: protection by mildly acidic pH and lack of protection by antioxidants*. Transpl Int, 1995. **8**(2): p. 77-85.
104. Lehmann, C., et al., *Effects of the stable prostacyclin analogue iloprost on the plasma disappearance rate of indocyanine green in human septic shock*. Intensive Care Med, 2000. **26**(10): p. 1557-60.
105. Harada, N., et al., *Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin*. Blood, 1999. **93**(1): p. 157-64.
106. Moller, A.D. and P.O. Grande, *Beneficial effects of low-dose prostacyclin on cat intestinal perfusion during endotoxemia as evaluated with microdialysis and oxygen transport variables*. Crit Care Med, 2001. **29**(2): p. 351-8.
107. Lo, C.J., M. Fu, and F.R. Lo, *Prostaglandin I2 analogue, iloprost, down regulates mitogen-activated protein kinases of macrophages*. J Surg Res, 1998. **76**(2): p. 159-64.
108. Boxer, L.A., et al., *Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence by prostacyclin*. J Lab Clin Med, 1980. **95**(5): p. 672-8.
109. Braun, M., et al., *Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2568-75.
110. Della Bella, S., et al., *Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2001. **65**(2-3): p. 73-83.

111. Junge, T., *Systematische Untersuchung des Einflusses von Iloprost auf die durch Ischämie und Reperfusion geschädigte marginale Leber im extrakorporalen Perfusionsmodell*. DISSERTATION Charité, CVK, Berlin, Deutschland, 2012.
112. Neumann, U.P., et al., *Reduction of reperfusion injury with prostacyclin I2 after liver transplantation*. *Transplant Proc*, 1999. **31**(1-2): p. 1029-30.
113. Neumann, U.P., et al., *Administration of prostacyclin after liver transplantation: a placebo controlled randomized trial*. *Clin Transplant*, 2000. **14**(1): p. 70-4.
114. Glanemann, M., et al., *Clinical implications of hepatic preservation injury after adult liver transplantation*. *Am J Transplant*, 2003. **3**(8): p. 1003-9.
115. Linnemann, M.K., M., *Biochemie 7. Auflage*. 2005.
116. Farmer, D.G.A., F.; Kupiec-Weglinski, J.W.; Busuttill, R.W., *Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver*. *Transpl Rev*, 2000. **14**(2): p. 106-126.
117. Steininger, R., et al., *Protective effect of PGI2 and diltiazem on liver ischemia and reperfusion in pigs*. *Transplant Proc*, 1988. **20**(5): p. 999-1002.
118. Goto, S., et al., *Efficacy of PGI2 analog in preventing ischemia reperfusion damage of liver grafts from living donors*. *Transpl Int*, 1992. **5 Suppl 1**: p. S366-9.
119. Gedik, E., et al., *Iloprost, a prostacyclin (PGI2) analogue, reduces liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in rats*. *Acta Cir Bras*, 2009. **24**(3): p. 226-32.
120. Klein, M., et al., *Preconditioning of donor livers with prostaglandin I2 before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury*. *Transplantation*, 1999. **67**(8): p. 1128-32.
121. Monden, M. and J.G. Fortner, *Twenty-four- and 48-hour canine liver preservation by simple hypothermia with prostacyclin*. *Ann Surg*, 1982. **196**(1): p. 38-42.
122. Sanchez-Urdazpal, L., et al., *Improved liver preservation with addition of iloprost to Eurocollins and University of Wisconsin storage solutions*. *Transplantation*, 1991. **52**(6): p. 1105-7.
123. Toledo-Pereyra, L.H., *Role of prostaglandins (PGI2) in improving the survival of ischemically damaged liver allografts*. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1984. **30**: p. 390-4.
124. Straatsburg, I.H., et al., *Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after cold storage using UW, HTK, and Celsior*. *Transplantation*, 2002. **74**(4): p. 458-64.



125. Nowak, G., et al., *Metabolic changes in the liver graft monitored continuously with microdialysis during liver transplantation in a pig model*. Liver Transpl, 2002. **8**(5): p. 424-32.
126. Totsuka, E., et al., *Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol, and prostaglandin I2 analogue, OP-41483*. J Am Coll Surg, 1998. **187**(3): p. 276-86.
127. Baumstark, C., et al., *Intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in hepatocytes under experimental transplantation conditions*. Transpl Int, 2002. **15**(5): p. 233-9.
128. Trump, B.F. and I.K. Berezsky, *Calcium-mediated cell injury and cell death*. FASEB J, 1995. **9**(2): p. 219-28.
129. Gnaiger, E., et al., *Mitochondrial defects by intracellular calcium overload versus endothelial cold ischemia/reperfusion injury*. Transpl Int, 2000. **13 Suppl 1**: p. S555-7.
130. Helling, T.S., et al., *The effect of prostaglandin E1 on liver adenine nucleotides and cytoplasmic enzymes in a porcine model of normothermic hepatic ischemia*. Hepatology, 1995. **22**(5): p. 1554-9.
131. Glanemann, M., et al., *Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury*. Surgery, 2004. **135**(2): p. 203-14.
132. Zeitlinger M., Müller M., Joukhadar Ch.  
*Lung Microdialysis- A Powerful Tool for the Determination of Exogenous and Endogenous Compounds in the Lower Respiratory Tract ( Mini-Review)*  
The AAPSJournal 2005; 7 (3) Article 62
133. Kawada, N., et al., *The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus*. Eur J Biochem, 1993. **213**(2): p. 815-23.
134. Abu-Amara, M., et al., *The nitric oxide pathway--evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury*. Liver Int, 2012. **32**(4): p. 531-43.
135. Kim, J.S., et al., *Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1533-43.
136. Guarner, F., M. Fremont-Smith, and J. Prieto, *Cytoprotective effect of prostaglandins on isolated rat liver cells*. Liver, 1985. **5**(1): p. 35-9.
137. Nowak, G., et al., *Clinical experience in continuous graft monitoring with microdialysis early after liver transplantation*. Br J Surg, 2002. **89**(9): p. 1169-75.

138. Haugaa, H., et al., *Clinical experience with microdialysis catheters in pediatric liver transplants*. Liver Transpl, 2013. **19**(3): p. 305-14.
139. Haugaa, H., et al., *Early bedside detection of ischemia and rejection in liver transplants by microdialysis*. Liver Transpl, 2012. **18**(7): p. 839-49.
140. Nilsson, O.G., et al., *Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration*. Neurosurgery, 1999. **45**(5): p. 1176-84; discussion 1184-5.
141. Hillered, L., et al., *Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. **64**(4): p. 486-91.
142. Farber, J.L., *The role of calcium in cell death*. Life Sci, 1981. **29**(13): p. 1289-95.
143. Leaf A, *Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume*. Biochem J 1956;62:241
144. Finter FA, *Wirkung unterschiedlicher NO-Donatoren bei Phorbol-ester-induzierter akuter pulmonaler Hypertonie am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge*  
Dissertationsschrift 12/2004 Universität Würzburg
145. Greig P.D., Woolf G.M., Abecassis M., Forster J.  
*PGE1 for primary nonfunction following liver transplantation*  
Transpl. Proc. 1989, vol 21, no.2 pp.3360-3361

### III. Anhang

#### Tabelle C

Bundesärztekammer: Richtlinien zur Organtransplantation  
nach § 16 TPG, Änderung. Deutsches Ärzteblatt, 2004. 101(A): p. 246-247.

Bisher existieren nur für die Lebertransplantation spezifizierte erweiterte Spenderkriterien.

#### Dies sind alternativ:

- Alter des Spenders > 65 Jahre,
- Intensivtherapie einschließlich Beatmung des Spenders > 7 Tage,
- Adipositas des Spenders mit BMI > 30,
- Fettleber (histologisch gesichert) > 40 %,
- S-Natrium > 165 mmol/l (letzter Wert vor der Spendermeldung),
- SGOT oder SGPT > 3 x normal (letzter Wert vor der Spendermeldung) oder
- S-Bilirubin > 3 mg/dl (letzter Wert vor der Spendermeldung)

#### Tabelle D

##### Die Konservierungslösung :

#### Custodiol /HTK : Zusammensetzung: 1000ml Lsg. enthalten:

Arzneilich wirksame Bestandteile:

0,8766g NaCl	15 mmol
0,6710g KCl	9,0
0,8132g MgCl <sub>2</sub> Hexahydrat	4,0
3,7733g Histidinhydrochlorid-Monohydrat	18
27,9289g Histidin	180
0,4085g Tryptophan	2 mmol
5,4651g Mannitol	30
0,0022gCaCl <sub>2</sub> mal <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,015mmol
0,1842g Kalium-hydrogen-2-oxopentandioat ( = Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat)	1mmo

Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Neue Bergstrasse 3-7, 64665 Alsbach-Hähnlein

**Tabelle F**

<b>500ml HAES 6%:</b>	
1000 ml enthalten:	
Arzneilich wirksame Bestandteile:	
Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke	60,0g
Substitutionsgrad 0,4-0,55	
Durchschnittsmolekulargewicht	200 000
Natriumchlorid	9,0g
Na+	154 mmol/l
Cl-	154 mmol/l
Sonstige Bestandteile:	
Natriumhydroxid	
Salzsäure	
Wasser für Injektionszwecke	pH- wert 3,5-6,0
Titrationacidität	<1 mmol NaOH/l
<b>theoretische Osmolarität : 308 mosm/l</b>	
HAES-steril 6%: 6% Hydroxyethylstärke (HES 200/0,5) in isotonischer Natriumchloridlösun	

**Fresenius Kabi Deutschland GmbH, D-61346 Bad Homburg**

**Tabelle G** 1500 ml Dialysat:

Basislösung zur Bicarbonat-Hämodilution SH-BIC 35  
Zusammensetzung 1000 ml:

<b>arzneilich wirksame Bestandteile:</b>			
	<b>g</b>		<b>mmol/l</b>
NaCl	6,18	Na+	148,5
Natriumhydrogencarbonat	3,59	Cl-	105,75
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	42,75
Sonstige Bestandteile:		Theoretische Osmolarität 297 (mOsm/l)	
CO <sub>2</sub> , Wasser für Injektionszwecke			

Elektrolytlösung zur Bicarbonat- Hämofiltration: SH-EL 02

<b>SH-EL 02: 1000ml enthalten</b>			
		<b>g(Gramm)</b>	<b>mmol/l</b>
NaCl		4,21	Na+
KCl		1,34	K+
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O		1,98	Ca <sup>++</sup>
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		0,91	Mg <sup>++</sup>
Glukose- Monohydrat (=9g wasserfrei Glc. Salzsäure, Wasser für Injektionszwecke)		9,9	Cl- Theoretische Osmolarität 311 mOsm/l
			72
			18
			13,5
			4,5
			153

**Zusammensetzung der gebrauchsfertigen Hämofiltrationslösung:**

Hämofiltration SH-EL02

nicht allein verwenden, mischen der Elektrolytlösung mit der Basislösung

Die erhaltene gebrauchsfähige Lösung enthält 2mmol/l Kalium (SH-BIC 35-02)

<b>1000 ml gebrauchsfertige SH-BIC 35-02 Hämofiltrationslösung enthalten Elektrolyte</b>	<b>in mmol/l</b>
Na+	140
K+	2
Ca <sup>++</sup>	1,5
Mg <sup>++</sup>	0,5
Cl-	111
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	35
wasserfreie Glukose	5,5 (=1g)
theoretische Osmolarität in mOsm/l	296
pH	7,2-7,5

**Pharmazeutischer Unternehmer : B.Braun Medizintechnologie GmbH D-34212  
Melsungen**

**Kraft W und Dürr UM,  
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin  
6. Auflage Schattauer Verlag 2005**

Harnstoff 20-50 mg/dl , 3,3-8,3 mmol/l

AST bei Schwein ist nicht leberspezifisch, kommt im Cytoplasma und Mitochondrien vor

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>Kommentar</b>
<b>Ast</b>	Bis 35 U/l	Stark abhängig von Rasse, Alter, Reproduktionsstatus
<b>Alt</b>	Bis 68 U/l	Pietrain bis 65,(Kixmüller 2004)
<b>GLDH</b>	Bis 4 U/L	MERk 1992, stark altersabhängig: Läuferschweine: bis 6U/l (Plank 1988)
<b>Gamma- GT</b>	Bis 45 U/l	Kixmüller 2004, Dt. Landrasse, Dt. Edelschwein bis 30 U/l
<b>Glukose</b>	70- 115 mg/dl o. 3,9 bis 6,4 mmol/l	Bei Aufregung oder Stress deutlich höher, bis weit über 200 mg/dl o. 11 mmol/l
<b>Harnstoff</b>	20-50 mg/dl o. 3,3- 8,3 mmol/l	Serum, Plasma
<b>Kalium</b>	4,0-5,0 mmol/l	Plasma, Serum, Vollblut
<b>Calcium</b>	2,4- 3,5 mmol/l GesamtCalcium	
<b>Natrium</b>	140-160 mmmol/l	
<b>Chlorid</b>	102- 106 mmol/l	
<b>Hkt</b>	33-45 %	
<b>Hämoglobin</b>	10,8- 14,8 g/dl, 6,7- 9,2 mmol/l	
<b>PH</b>	7,42	
<b>PO2</b>	98 mmHg	
<b>PCO2</b>	50 mmHg	
<b>LDH nicht angegeben</b>		

#### **IV. Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Gero Puhl, der diese Arbeit ermöglicht hat und durch den ich im Rahmen der Doktorarbeit eine Vorliebe zur operativen Tätigkeit entwickelt habe. Es war eine überaus große Bereicherung, einem solch erfahrenen Chirurgen zu assistieren und unter seiner Betreuung diese Doktorarbeit zu bestreiten.

Ein sehr großer Dank gilt Dr. med. Wenzel Schöning, der mir mit Rat, viel Erfahrung und großem Engagement jederzeit zur Seite stand, in dessen Auto wir morgens um fünf Uhr, begleitet von Radio Eins, zum Schlachthof fahren, um das Blut für die Perfusionen zu holen. Ich bin Herrn Dr. med. Wenzel Schöning dankbar für die stete Offenheit, den Gedankenaustausch und seinen Optimismus.

Des Weiteren erinnert diese Dissertation an die gemeinsame Zusammenarbeit mit Tanoa Junge, Spiridoula Coskina und Frau Hungerbühler sowie dem Team der tierexperimentellen Einrichtung und dem Labor der Charité.

Ohne diese Menschen, Ihre Erfahrung und Routine wäre kein Ergebnis zustande gekommen.

Weiterhin bin ich meinem Ehemann Michael Scholl und meiner Familie für die ausnahmslose Unterstützung und Motivation dankbar.

- Am Ende des Tunnels zeigte sich immer wieder ein Licht -

## **V. Lebenslauf**

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



## VI. Eidesstaatliche Erklärung

„Ich, Ines Scholl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prostaglandin I 2 (Iloprost) reduziert den Ischämie/ Reperfusionsschaden der marginalen Schweineleber - Untersuchung im extrakorporalen Leberperfusionskreislauf-“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Ines Scholl