

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

DISSERTATION

Der MEGX-Test im Vergleich mit den histologischen Befunden in  
Empfängerlebern im Modell der orthotopen Rattenlebertransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clemens Dobis

aus Mannheim

Gutachter:       1. Priv.-Doz. Dr. med. D. Seehofer  
                      2. Prof. Dr. med. R. Viehbahn  
                      3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Knoop

Datum der Promotion: 18.11.2011

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen von syngeneten Rattenlebertransplantationen mit Lewis-Ratten wurde von uns postoperativ der Monoethylglycinxylylid-Test (MEGX-Test) an den transplantierten Tieren durchgeführt. Die Zielsetzung war festzustellen, ob der MEGX-Test sensitiv genug ist auch geringgradige Hepatozytenschädigungen in der Leberhistologie nach Lebertransplantation bei unterschiedlich langen Konservierungszeiten nachzuweisen. Dazu wurden den Tieren 2mg/kg/Körpergewicht Lidocain intravenös injiziert. Es wurden Blutentnahmen vor, 15' bzw. 30 min. nach Injektion durchgeführt und mittels TDX-Prozessor auf MEGX analysiert.

Diese Arbeit zeigt im untersuchten Tiermodell eine sichere Korrelation zwischen dem MEGX-Wert und dem Grad des histologischen Hepatozytenuntergangs und damit die Reduktion der Metabolisierungsleistung.

Die durch unterschiedlich lange kalte Ischämiezeiten geschädigten Transplantate weisen je nach Konservierungszeit einen ischämischen Hepatozytenschaden mit gesamt reduzierter Cytochrom P-450-Menge auf. In dieser Arbeit können wir aufzeigen, dass die MEGX-Test-Werte den Grad des histologischen Hepatozytenuntergangs und damit die Reduktion der Metabolisierungsleistung genau reflektieren. Der Zusammenhang zwischen MEGX-Testwert und der Histologie ist fast linear zu nennen. Das Ergebnis dieser Arbeit ist, dass das MEGX-Testergebnis signifikant von der strukturellen Integrität des Lebertransplantates abhängt. Die von uns im Tiermodell erhobenen Daten spiegeln die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse wieder, dass der MEGX-Test ein globaler Indikator für die funktionale Integrität von angebotenen und zu transplantierenden Lebern ist. Der MEGX-Test scheint auch damit in der Lage zu sein, in den ersten postoperativen Tagen nach einer Lebertransplantation Schäden durch Konservierung, Reperfusion, initiales Nichtfunktionieren (INF) und anderer Faktoren abzuschätzen und einen Kurzzeitverlauf zu prognostizieren.

Zusammenfassend ist der MEGX-Test ein schneller, dynamischer und kostengünstiger Test, der ein gutes histologisches Grading ermöglicht und somit in der Lage sein kann Leberbiopsien einzusparen. In den folgenden Jahren nach unseren Untersuchungen hatte sich dieser Test in der Transplantations-Medizin bei speziellen Fragestellungen bewährt. Durch die erhebliche Weiterentwicklung in der Radiologie, wo mittels 3D-CT, MRT und passenden Softwarelösungen (z.B. AMIRA) gute mehrdimensionale

Darstellungen der Leber, der arteriellen und venösen Versorgung, der Gallenwege, sowie des Leberparenchyms ermöglicht werden ist der MEGX-Test in seiner Aussagekraft durch diese Verfahren verdrängt worden. Dennoch haben viele Großlabore die MEGX-Bestimmung in Ihrem Angebot.

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	3
Abbildungsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Danksagung	9
Erklärung	10
Lebenslauf	11
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1. Historischer Rückblick und aktuelle Situation der Lebertransplantation (LTx)	12
1.2. Die Ratte als TX-Versuchstier	14
1.3. Leber-Funktions-Tests	17
1.4. Der MEGX-Test	20
<b>2. Fragestellungen</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1. Versuchstiere	23
3.2. Rattenleberexplantation und –transplantation	23
3.2.1. Die Explantation der Spenderleber	23
3.2.2. Organkonservierung	25
3.2.3. Die orthotope Rattenlebertransplantation	26
3.3. Der MEGX-Test	29
3.3.1. Lidocain	29
3.3.2. Technische Durchführung des MEGX-Tests	30
3.3.2.1. Der Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay (FPIA)	31
3.4. Asservierung Histologischer Proben	35
3.4.1. Aufarbeitung der Histologie	35
3.4.1.1. Färbungen und Auswertung	35
3.5. Statistische Methoden	39
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1. Histologische Untersuchungsergebnisse	40
4.2. Laborchemische Ergebnisse MEGX-Test	41

4.3. Statistische Auswertung	44
<b>5. Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1. Beschriebene Untersuchungen an gesunden Probanden	53
5.2. Beschriebene Untersuchungen an Leberzirrhotikern	55
5.3. Beschriebene Untersuchungen an Leberspendern	56
5.4. Beschriebene Untersuchungen an Transplantatempfänger	57
5.5. Die Validität der Prognose des MEGX-Test im Vergleich zu anderen klinischen Parametern	57
5.6. Der MEGX-Test im Vergleich zu anderen Leberfunktionstests	58
5.6.1. Indocyaningrün Test (ICG)	58
5.6.2. Die Galactoseeliminationskapazität (GEK)	58
5.6.3. Der 14C Aminopyrinatemtest	59
5.6.4. Der Coffein-Test	59
5.6.5. Der Bromsulphophthalein Test	59
5.7. Der MEGX-Test im Vergleich	60
5.8. Der MEGX-Test im Tiermodell – Vergleiche zum Menschen	60
5.9. Eigene Ergebnisse – Auswirkungen auf die klinische Medizin	62
5.9.1. Nachwort	64
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

		<i>Seite</i>
Tabelle 1	Der Pugh Child Score	18
Tabelle 2	Leberfunktionstests	19
Tabelle 3	Zusammensetzung der UW-Konservierungslösung	26
Tabelle 4	Zusammensetzung der Carolina Rinse Solution	26
Tabelle 5	MEGX-Werte der histologischen Leberschädigung Grad 1	41
Tabelle 6	MEGX-Werte der histologischen Leberschädigung Grad 2	42
Tabelle 7	MEGX-Werte der histologischen Leberschädigung Grad 1	43
Tabelle 8	MEGX-Werte in µg/l 15 min. nach Lidocaingabe zu den histologischen Graden 1-3	44
Tabelle 9	MEGX-Werte in µg/l 30 min. nach Lidocaingabe zu den histologischen Graden 1-3	45
Tabelle 10	Statische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 2 zum Zeitpunkt t-15	47
Tabelle 11	Statische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 3 zum Zeitpunkt t-15	48
Tabelle 12	Statische Auswertung: Histologischer Grad 2 zu 3 zum Zeitpunkt t-15	49
Tabelle 13	Statische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 2 zum Zeitpunkt t-30	50
Tabelle 14	Statische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 3 zum Zeitpunkt t-30	51
Tabelle 15	Statische Auswertung: Histologischer Grad 2 zu 3 zum Zeitpunkt t-30	52
Abbildung 1	Der Lidocain Metabolismus	21
Abbildung 2	Der Metabolisierungsschritt von Lidocain zu MEGX	29
Abbildung 3	Chemisches Prinzip des Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assays	32
Abbildung 4	Das TDx-System	33
Abbildung 5	Konzentrationsverlauf von MEGX	53
Photo 1	Blick in den Rattensitus	31
Photo 2	Leberhistologie Schädigungsgrad 1	36
Photo 3	Leberhistologie Schädigungsgrad 2	37
Photo 4	Leberhistologie Schädigungsgrad 3	38
Diagramm 1	Darstellung der Mediane	46

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Primäres Nicht Funktionieren	PNF
Rattenlebertransplantation	RLT
Lebertransplantation	LTx
Monoethylglycinexylidid	MEGX
Orthotope Rattenlebertransplantation	ORLT
Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay	FPIA
Heptocelluläres Carzinom	HCC
Glycinexylidid	GX



## Danksagungen / Widmungen

Der Autor bedankt sich bei Prof. Dr. med. Peter Neuhaus für die Überlassung des Themas und die stetige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser experimentellen Arbeit. Ferner bedanke ich mich bei PD. Dr. med. Daniel Seehofer für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt PD. Dr. med. Heinrich Keck, PD. Dr. med. Michael Knoop und Frau Dr. med. Sigrid Bachmann-Brand, die mir durch Rat und Tat jederzeit zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. med. Lobeck und seinem Team im Pathologischen Institut des Rudolf-Virchow-Krankenhaus möchte ich für die hilfreiche Unterstützung bei der histologischen Auswertung danken.

Dank gebührt auch Frau Michaela Postels, die mir die Funktionsweise des TDx-Prozessors vermittelt hat.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Unger und Herrn Mohnhaupt.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin gilt mein herzlicher Dank.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, insbesondere meinem Vater der immer an mich geglaubt hat und leider die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr erlebt hat.

## Erklärung

„Ich, Clemens Dobis, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der MEGX-Test im Vergleich mit den histologischen Befunden in Empfängerlebern im Modell der orthotopen Rattenlebertransplantation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

16.12.2010

Clemens Dobis

## Lebenslauf

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

# 1. Einleitung

## 1.1. Historischer Rückblick und aktuelle Situation der Lebertransplantation (LTx)

Am 1. März 1963 schlug Starzl in Denver, Colorado mit der ersten allogenen Lebertransplantation beim Menschen ein neues Kapitel in der Transplantationschirurgie auf. In den folgenden vier Jahren folgten durch ihn weitere sieben Transplantationen, es überlebte jedoch kein Patient länger als 23 Tage. Die Gründe für die kurze Überlebenszeit waren vielfältig, unter anderem der schlechte Zustand der Transplantatempfänger wie auch der Organspender, die noch ungenügende Konservierungsmöglichkeiten, die anästhesiologischen Probleme vor allem während der anhepatischen Phase, die neue Operationstechnik und eine noch nicht ausgereifte Immunsuppression. (STARZL et al. 1990)

In den vergangenen vierzig Jahren haben sich sowohl die Operationstechnik, die Möglichkeiten der Intensivmedizin, das pharmakologische Therapiekonzept durch die Entwicklung wirksamerer Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Tacrolimus und Mycophenolatmofetil, Poly- und Monoklonale Antikörper weiterentwickelt. (MILLIS et al. 1995) Es wurden die Konservierungslösungen durch Zugabe von z.B. Calcium-Kanal-Blocker oder Radikalfänger und andere Substanzen modifiziert, um eine größtmögliche Organprotektion der Spenderorgane während der Ischämiezeiten zu erreichen. (BRETTSCHEIDER et al. 1969; GUBERNATIS et al. 1990; THURMAN et al. 1989; UMESHITA et al. 1989; TAKAI et al. 1990; BACHMANN et al. 1992) Die Lebertransplantation ist heute ein etabliertes Therapieverfahren für Patienten mit terminalen Lebererkrankungen. (CLAVIEN et al. 1992) Die 5-Jahres Überlebenszeit nach einer orthotopen Lebertransplantation beträgt in Deutschland zurzeit 70 - 80%. (Smit et al. Jahresbericht Deutsche Stiftung Organtransplantation 2007) Wenn die Transplantation bei Patienten mit neoplastischen Lebererkrankungen (z.B. kleines uninoduläres HCC) durchgeführt wird sind die Erfolge mittlerweile gleich gut. (FIGUERAS et al. 1997; LLOVET et al. 1998) Durch die zunehmenden Erfolge der klinischen Lebertransplantation und der nicht im gleichen Maße steigenden Menge an Spenderlebern, klafft die Schere zwischen verfügbaren Spenderlebern und Organempfängern weit auseinander. (SCHRÖDER et al. 1989)

Durch dieses Missverhältnis steigt die Mortalität auf der Warteliste. Es sterben jedes Jahr im Bereich der Verteilungsstelle Eurotransplant unverändert etwa 500 Patienten während der Wartezeit auf eine Spenderleber. (Cohen et al. ET- Jahresbericht 1999)

Hierdurch zeigt sich eine vermehrte Akzeptanz der Organe marginaler Spender. Eine weitere Alternative ist die Teilung der Spenderleber um sie für zwei Empfänger zu nutzen. (Brölsch et al. 1999) Wie aber erkennt man eine schon vorgeschädigte Leber, bevor man sie einem potentiellen Empfänger anbietet, zumal der Zeitaufwand möglicher Untersuchungen in der ohnehin knappen Zeitspanne einen wichtigen Faktor darstellt? Neben einer sorgfältigen Spenderanamnese werden die Infektions- und Serumparmeter wie ALAT, ASAT, GLDH, AP, gGT, Albumin, CHE, Bilirubin und Gerinnungswerte, der Verlauf auf der Intensivstation sowie auch der Unfallmechanismus als Bewertungseinheiten herangezogen. Dazu zählt insbesondere die Stabilität des Kreislaufs. Größere hypotone Perioden, großer Blutverlust mit Massentransfusionen oder hoher Katecholaminverbrauch sind als ungünstig für die Organe anzusehen. Des Weiteren ist die unterschiedliche fachliche Ausrichtung der Intensivmedizin in den Krankenhäusern ein nicht zu unterschätzendes Problem, zumal in vielen Krankenhäusern das Thema Organspende noch immer mit sehr viel Ressentiments behaftet ist und häufig eine Entscheidung zur Hirntoddiagnostik erst dann erfolgt, wenn die zur Organspende geeigneten Organe schon erheblich geschädigt sind. (Dobis persönlich DSO 2004). Dies sind alles Faktoren die bei der gefürchteten Primären-Nicht-Funktion (PNF) einen großen Einfluss haben. Neben diesen klinischen vitalen Einflussgrößen ist die Konservierung der Spenderleber postmortal und extrakorporal eine zusätzliche Einflussgröße. Die Leber ist ein sehr stoffwechselaktives, mit hohem Energieumsatz behaftetes Organ. Schädigungen im Übergang der warmen zur kalten Ischämie können leicht auftreten. (MEYER ZU BÜSCHENFELDE, HÜTTEROTH 1992) Diese Schädigungen, die Höhe des Katecholaminverbrauchs und die Dauer der Intensivpflege korreliert mit der PNF (BALDERSON et al. 1992)

Die PNF ist durch Stagnation von Bilirubinproduktion, Gerinnungsversagen und Ausbildung einer Enzephalopathie als Ausdruck des Leberfunktionsausfalls gekennzeichnet. Eine Retransplantation kann erforderlich werden. (BOUDJEMA et al. 1991) Durch die verbesserte Intensivmedizin lässt sich dieser Zeitraum auf bis zu 21 Tagen ausweiten, bevor eine Retransplantation erfolgen muss.

Die Entscheidung im Spenderkrankenhaus, ob eine Spenderleber angeboten bzw. akzeptiert wird, hängt einerseits von der Einschätzung des Spenderkoordinators, sowie

von der subjektiven Einschätzung und Erfahrung des explantierenden Chirurgen ab. In seine Entscheidungsfindung fließen neben den schon genannten klinischen Faktoren Merkmale wie Verfettungszustand, Konsistenz, Randbeschaffenheit und makroskopische Integrität der Spenderleber ein. In einigen Fällen kann nur eine schnelle histologische Beurteilung die endgültige Entscheidung unterstützen. Ergänzend zu dieser subjektiven Beurteilung stehen auch verschiedene Leberfunktionstests zur Verfügung, die die Exkretions- und die Metabolisierungsleistung testen. (POTTER et al. 1992 ,1994) Letztendlich bleibt die Entscheidung ob das Organ verwendet wird bei dem explantierenden Chirurgenteam. (MAKOWKA et al. 1987) Das Angebot eines validen Leberfunktionstest erleichtert hierbei die Entscheidungsfindung. In den letzten Jahren ist der MEGX-Test als Leberfunktionstest entwickelt worden. Es handelt sich dabei um einen Test der die Metabolisierungsfähigkeit der Hepatozyten bei der Belastung mit Lidocain misst und wurde nach dem Hauptmetabolit Monoethylglycinexylidid (MEGX) benannt.

Oellerich und Adam vermuten, dass dem Explantationsteam durch diesen Test eine Entscheidungshilfe bei der Auswahl von Spenderlebern an die Hand gegeben werden kann. (OELLERICH et al. 1989, 1991 ; ADAM et al. 1991)

In dieser tierexperimentellen Arbeit soll unter standardisierten Bedingungen untersucht werden, ob der MEGX-Test mit den histologischen Befunden in den Spenderlebern nach orthotoper Rattenlebertransplantation bei unterschiedlich langer Konservierungszeit korreliert.

## 1.2. Die Ratte als TX-Versuchstier

Ein Modell zur Rattenlebertransplantation (RLT) mit den Mitteln der Mikrochirurgie wurde, unter Zugrundelegung des heterotopen Hundemodells von Welch und 1966 als heterotope Leberteiltransplantation erstmalig von Lee und Edington 1966 beschrieben. Welch's Hunde-Modell beinhaltet einen portosystemischen Shunt zur Entlastung des Pfortaderstromgebiets während der Anastomosierungszeit des Lebertransplantats. (WELCH et al. 1955) 1973 wurde dann von Lee die erste orthotope Rattenlebertransplantation (ORLT) mittels eines miniaturisierten extracorporalen portojugularen Shunts durchgeführt. Dieses Model beinhaltet auch die Anastomosierung der A. hepatica. (LEE et al. 1973) Das Model einer orthotopen Lebertransplantation versteht sich als Entfernung der nativen Leber und Austausch gegen die Spenderleber an der anatomisch richtigen Position.

1975 stellte dann Lee sein verifiziertes Modell vor, in dem auf einen portosystemischen Shunt und auf eine Rearterialisierung der A. hepatica verzichtet wurde. (LEE et al. 1975).

Durch die Einführung von Cuff-Techniken mit zylindrischen Kunststoff-, Metall- oder Teflontuben bei Rattenlebertransplantationen anstatt der herkömmlichen Nahttechnik bei der Anastomose der V. portae und der infrahepatischen V. cava wurde die Operation erheblich erleichtert und die anhepatische Phase deutlich verkürzt. (KAMADA and CALME 1979; 1983)

Durch diese Zeitersparnis in der anhepatischen Phase wurde die Diskussion um die Rearterialisierung der A. hepatica und deren Nutzen vermehrt geführt. Der Vorteil von rearterialisierten ORLT begründet sich darauf, dass der Ductus choledochus hauptsächlich durch die A. hepatica mit Blut versorgt wird, und bei Nichtanschluß der A. hepatica eine kapilläre Einsprossung zur Versorgung des Ductus choledochus mindestens 7 Tage benötigt. Die innerhalb dieser Zeitspanne entstandenen ischämischen Gallengangsepithelschäden können zu Gallengangsnekrosen im Transplantat führen. (ENGEMANN 1989)

In den folgenden Jahren wurden in der Literatur auch von anderen Arbeitsgruppen rearterialisierte Transplantationsmodelle bei Ratten beschrieben. (KNOOP et al. 1993 ; KAMADA et al. 1992; STEFFEN et al. 1989)

Im Vergleich von physiologischen Transplantationsmodellen und nicht arterialisierten Modellen zeigt sich bei den arterialisierten Modellen eine Verbesserung der Überlebensrate bei Ratten von mehr als 80% bei 100 Tagen Beobachtungsdauer. (LIE et al., 1983; KNOOP et al. 1993)

Knoop und Steffen verwenden die oben beschriebene Operationstechnik, so dass bei ihren ORLTs mit der Erstellung der anatomischen Anastomosen:

1. Suprahepatische Vena cava,
2. Vena portae,
3. Infrahepatische Vena cava,
4. A. hepatica und
5. Gallenganganastomose

ein sicheres Arbeiten mit guten chirurgischen Ergebnissen möglich ist. (KNOOP et al. 1994; STEFFEN et al. 1989) Im Wesentlichen wird in der heutigen Zeit das von Steffen beschriebene Modell der rearterialisierten OLRT's durchgeführt.

Die Ratte bietet sich als Versuchstier in der experimentellen Transplantationschirurgie an, da die Tiere leicht zu halten, und in großer Anzahl als syngene Tiere verfügbar sind. Um evtl. immunologische Indifferenzen als störende Faktoren von vorne herein auszuschließen bietet es sich daher an, auf ein Inzuchtmodell zurück zu greifen. Bei der orthotopen Rattenlebertransplantation mittels ingezüchteten syngenen Lewis-Ratten kann aufgrund der fehlenden Abstoßungsreaktionen die oben genannte Problematik umgangen werden. Zudem lässt sich auf immunsuppressiv wirkende Medikamente verzichten. (KNOOP et al. 1994)

Im Rahmen einer Lebertransplantation sind vier Phasen der Organschädigung möglich. Zunächst kann das Organ durch die warme Ischämie zum Zeitpunkt der Organentnahme geschädigt werden. Als nächste Schädigungsphase folgt die kalte Ischämiezeit während der Organlagerung. Im Rahmen der Anastomosierung tritt eine erneute warme Ischämie sowie ein Reperfusionsschaden auf. (CLAVIEN et al. 1992)

Die Mechanismen der Zellschädigung im Prozess der Ischämie sind noch nicht endgültig geklärt. Es gibt jedoch Versuche, die ablaufenden Prozesse zu beschreiben.

Während der warmen Ischämiezeit wird auf zellulärer Ebene eine Ischämie erzeugt. Die Glycolyse wechselt auf den anaeroben Weg und erzeugt Lactat, dieses Lactat führt zu einem aziden Milieu welches zur Hemmung der mitochondrialen Energiebildung und innerhalb von Minuten zum Abfall des ATP-Gehalts der Zelle führt. Dieses erzeugt einen Ausfall der Natrium/Kalium-ATPase. Hieraus resultiert ein Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration und damit verbunden, eine ödematöse Schwellung der Zelle. Die Permeabilität der Zellmembran für  $\text{Ca}^{2+}$  wird erhöht. Die dadurch vermehrt einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können nicht mehr aus der Zelle heraus gepumpt werden. Die Pufferfähigkeit der Mitochondrien erschöpft sich durch den persistierenden Energiemangel. Die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unter anderem freigesetzt aus dem endoplasmatischen Retikulum steigt weiter an. Durch den Ausfall der mitochondrialen Pufferkapazität kommt es zu Aktivierung von Phospholipasen und letztendlich zur Zerstörung zellulärer Membranstrukturen. Der gleiche Mechanismus gilt auch für die kalte Ischämie. (THURMAN et al. 1988; LANDON et al. 1986; RAO et al. 1988)

Ein weiteres Problem bei Transplantationen ist die Reperfusion des Organs. Die bei der Reperfusion ablaufende Reoxygenierung, kann als schädigender Faktor für den Zellstoffwechsel angesehen werden. Die während der Ischämie aus Xanthindehydrogenase gebildete Xanthinoxidase führt unter Sauerstoffzufuhr zur Bildung anorganischer freier Radikale, die zusammen mit einer Lipidperoxydation



phospholipidhaltiger Membranstrukturen zur weiteren Beschleunigung der Zellzerstörung beitragen. Dies gilt insbesondere für Endothelzellen mikrovascularer Stromgebiete. (RAO et al. 1990 ; WALSH et al. 1990 ; NEUMAYER et WAGNER 1987)

Eine Leber toleriert eine „warme“ Ischämiezeit von 60 bis 120 min. (NEUMAYER et WAGNER 1987) Bei einer Unterkühlung der Leber auf ca. 5°C verkräftet die Leber eine „kalte“ Ischämiezeit von 12 und mehr Stunden. (CLAVIEN et al. 1992)

Um diese entstanden Schädigungen abzuschwächen oder zu beseitigen bedient man sich verschiedene Konservierungslösungen. Der Zweck dieser Lösungen ist, das Organ oder das Gewebe schnell abzukühlen. Durch die Kühlung erreicht man, dass der ATP-Spiegel langsamer absinkt. Untersuchungen habe gezeigt, dass der ATP-Spiegel nur unwesentlich innerhalb einer Zeitspanne von 4 bis 8 Stunden im Zustand der kalten Ischämie sinkt. Die weiter beschriebenen Schädigungen versucht man durch Zusatz verschiedener zellprotektiver Pharmaka zu verlangsamen. Ein Ziel soll sein, die gebildeten Radikale zu binden und unschädlich zu machen. (RAO et al. 1990)

Bei Lagerung der Lebern in University of Wisconsin Lösung (UW-Lösung) werden je nach Konservierungszeiten Ballonierungen der Hepatozyten, Zerstörungen von Sinusendothelzelle und Gewichtsverlust der Lebern beobachtet. Diese Schäden sind jedoch deutlich geringer als bei anderen Konservierungslösungen. ( MOMII, KOGA 1990)

Bei der Transplantation muss die UW-Lösung aus dem Organ entfernt werden, da sie aufgrund der Zusammensetzung (Adenosin und Kalium) nicht in den Blutkreislauf gelangen darf. Dazu wird die zu transplantierende Leber kurz vor der Reperfusion mit Blut oder einer speziellen Spüllösung resp. Reperfusionslösung (Carolina-Rinse) gespült, das Zelldetritus auswaschen und Reperfusionsschäden vermindern soll. (BACHMANN et al. 1992 ; CLAVIEN et al. 1992)

### 1.3. Leber-Funktions-Tests

Bei leberinsuffizienten Patienten ist es klinisch bedeutsam, die Möglichkeit einer Mortalitätsprognose zu besitzen. Gerade bei den terminalen Lebererkrankungen wo die orthotope Lebertransplantation mittlerweile ein Standardverfahren ist, klafft die Schere zwischen den Spenderorganen und den auf ein Spenderorgan wartenden Patienten weit auseinander. (CLAVIN et al. 1992; Smit et al. Jahresbericht Deutsche Stiftung Organtransplantation 1999) Es stellt sich die Problematik, den optimalen Zeitpunkt einer Lebertransplantation zu finden, um nicht in die Gefahr zu geraten zu früh zu transplantieren und damit einem anderen wartenden Patienten evtl. ein dringender

benötigtes Organ vor zu enthalten. Andererseits darf man nicht so lange warten, dass der zu transplantierende Patient klinisch in einen solch schlechten Zustand gerät das er nicht mehr operationsfähig ist.

Da die Leber eine funktionelle Reservekapazität von über 80% hat, erkennt man Leberschäden oder eine Zirrhose erst spät. Kombinationen von Serumparametern wie ALAT, ASAT, GGT, GLDH, Albumin, Albuminfraktion, CHE, Blutgerinnung, fettlösliche Vitamine, Fe, Cu, Ammoniak können auf einen bestehenden oder im Beginn befindlichen Leberschaden nur hinweisen. Neben den invasiven Methoden der Leberbiopsie, der Laparoskopie und deren histologische Auswertung, sowie der nicht invasiven Sonographie stehen noch spezielle Leberfunktionstests und ein Punktbewertungsschema zur Verfügung. (HÄRING et al. 1990)

In dieser Arbeit soll der MEGX-Test als Leberfunktionstest in Korrelation mit histologischen Befunden gesetzt werden und seine Spezifität bezüglich des Erkennens von Leberschäden untersucht werden.

Pugh-Child-Score	1	2	3	Punkte
gesamt Bilirubin	< 34	- 51	>51	µmol/l
Albumin	>35	- 30	<30	g/l
Ascitis	nicht	mäßig	massiv	
neurologische Symptome	nicht	leicht	deutlich	
Allgemeinzustand	gut	reduziert	schlecht	Häring et. al. 1990

*Tabelle 1 Der Child-Pugh-Score*

Der Child-Pugh-Score ist ein Punktbewertungsschema, das bei leberkranken Patienten angewendet wird. In diesen Score werden verschiedene Parameter eingeschlossen. Dazu zählen laborchemische Serumparameter wie Bilirubin und Albumin. Des weitern fließen klinische Parameter wie Ascitis, neurologische Symptome und der Allgemeinzustand mit ein. Je nach Ausprägung und Schweregrad der Veränderungen werden Punkte verteilt und addiert. Die Summe erlaubt eine Einteilung in die Schweregrade: Pugh A, Pugh B und Pugh C.

Als Pugh A zählt 5-6 Punkte, Pugh B zählt 7-9 Punkte und als Pugh C zählt 10-15 Punkte. Je nach Einteilung kann über den Patienten eine momentane Einschätzung seiner Leberfunktion erstellt werden. In Stadium A ist die Prognose mit einer Mortalitätsrate von < 10% / Jahr am besten. Bei Pugh B beträgt die Jahresmortalitätsrate

bereits 20- 40%. Ab Pugh C Mortalitätsrate/Jahr >50% gelten die Patienten als Risikopatienten, eine Transplantation kann in diesem Stadium die Rettung bedeuten. Das Mortalitätsrisiko bei einer Transplantation ist in diesem Zustand jedoch stark erhöht. (ALBERS et al. 1989 ; STREMMEL et al. 1992)

Spezifische Leberfunktionstests spielen zurzeit in der klinischen Routinediagnostik eine nur untergeordnete Rolle. Die Gründe dafür sind vielfältig, einige der Tests sind zeitaufwendig, kostenintensiv und bezüglich Ihres Aussagewertes umstritten.

Die am häufigsten in der Klinik eingesetzten Leberfunktionstests sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Name des Tests	Reagenz	Untersuchtes Kompartiment	Dosis	Testdauer
Indocyaningrün-Test (ICG)	Indocyanin grün	Elimination ohne Metabolisation	0,5 mg/kg Körpergewicht	20 min.
Galaktoseeliminationskapazität (GEK)	Galaktose	Metabolisation unabhängig vom Cytochromsystem	0,5 mg/kg Körpergewicht	60 min
14 C-Aminopyrin- Atemtest	14C-Aminopyrin	Demethylierung durch das Cytochrom P-450-System	50 kBq <sup>14</sup> C - Aminopyrin	60 min
Coffein-Test	Coffein	Cytochrom-P-450-System	3 mg/kg Körpergewicht	24 Stunden
Bromsulfo-phthalein-Test	Bromsulfo-phthalein	Leberdurchblutung	Keine Angabe	45-60 min
MEGX-Test	Lidocain	Cytochrom-P-450-System	1-2 mg/kg Körpergewicht	30 min

Child-Pugh-Score	Kein Reagenz	Neurologie, Lebersyntheseleistung	Keine Angabe	Keine Angabe
------------------	--------------	-----------------------------------	--------------	--------------

*Tabelle 2 Leberfunktionstests*

Ende der neunziger Jahre wurde festgestellt, dass sich der Lidocain-Metabolismus und letztendlich ein daraus entstehendes Endprodukt „Monoethylglycinexylidide“ (MEGX) als Leberfunktionstest (MEGX-Test) eignen würde. (OELLERICH et al. 1989 , 1990)

#### 1.4. Der MEGX-Test

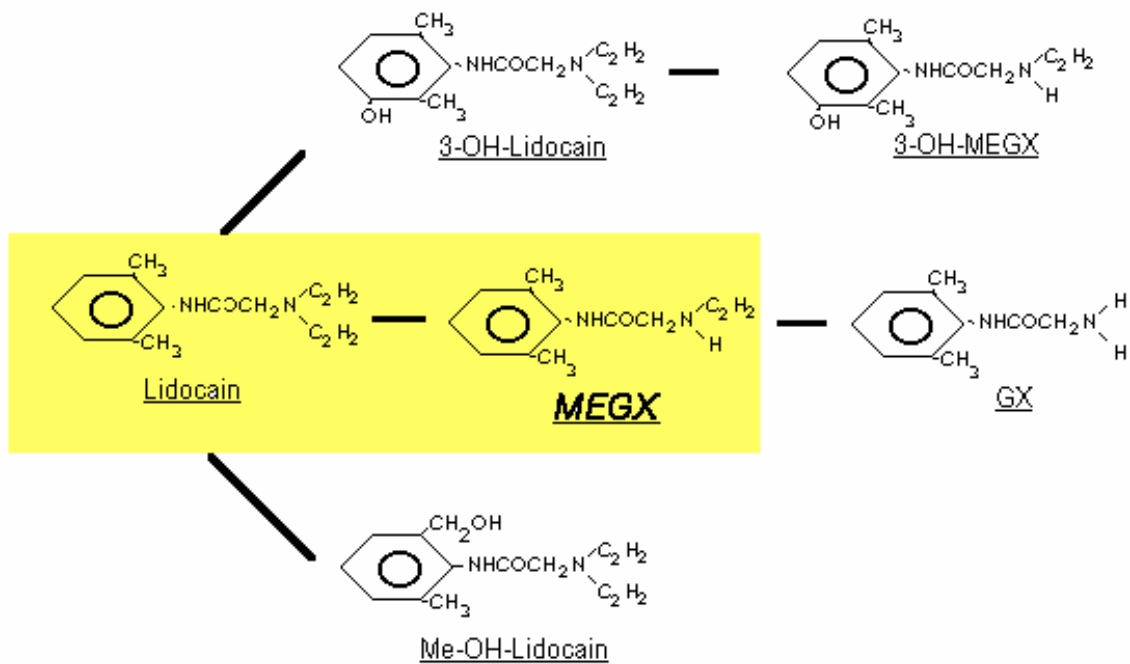
Als Ausgangssubstanz dient Lidocain (2-Diethylamino-2',6'-dimethylacetanilid). Es wurde 1948 entdeckt (synthetisiert) und ist in der Klinik als Lokalanästhetikum und als Antiarrhythmikum in Gebrauch. (RITCHIE, GREENE 1991) Lidocain wird in der Leberzelle durch Monooxygenasen wie Cytochrom P450 oxidativ deethyliert bzw. hydroxyliert und durch die auch im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Carboxylesterase enzymatisch hydroxyliert. Zwei Reaktionen spielen sich bei der Metabolisierung ab. Eine aromatische Hydroxylierung von Lidocain ergibt 3- oder 4-Hydroxylidocain und eine N-deethylierung ergibt Monoethylglycinexylidide (MEGX). (Nach diesem Abbauprodukt ist der Test benannt.) 3- oder 4-Hydroxylidocain wird entweder konjugiert oder durch N-deethylierung zu hydroxyliertem MEGX, dagegen wird MEGX weiter zu Glycinxylidid (GX) N-deethyliert, zu 3-Hydroxy-MEGX oder anderen Metaboliten hydroxyliert. Die Hydroxylierung ist gekennzeichnet durch eine hohe Spezifität und eine niedrige Kapazität, die N-deethylierung dagegen zeichnet sich durch eine niedrige Spezifität und eine hohe Kapazität im Lidocain-Metabolismus aus. (PANG et al. 1986 ; MASUBUCHI et al. 1991, 1992)

Etwa drei Prozent des zugeführten Lidocain wird unverstoffwechselt über die Nieren ausgeschieden, das gleiche gilt für 50% des entstandenen Glycinxylidid (GX) Es ist nicht geklärt, warum einige Personen eine stark erhöhte Lidocainclearance haben. Lidocain ist lipophiler als seine zwei Metaboliten MEGX und GX, es wird zu 50% an Plasmaproteine gebunden. GX ist am geringsten lipophil und bindet nur zu 5% an Plasmaproteine. MEGX rangiert mit seiner Polarität und Proteinbindung dazwischen. (YUTAKA et al. 1989)

MEGX und GX haben eine pharmakologische Aktivität, MEGX hat die gleiche antiarrhythmische Potenz wie Lidocain und wirkt auch lokalanästhetisch. Bei GX ist die antiarrhythmische Wirkung abgeschwächer als bei Lidocain. (DRAYER et al. 1983)

Genauere Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Menschen das Cytochrom-P-450NF bzw. Cytochrom P-450IIIA4 den Metabolismus von Lidocain zu MEGX katalysiert.

Abbildung 1 Der Lidocain Metabolismus



**Der Lidocain Metabolismus**

Abb. nach Masubuchi Y. et al. 1991

Zur Durchführung des MEGX-Test bekommt der Patient 1-2 mg/kg Körpergewicht Lidocain intravenös über 2 min injiziert. Blutentnahmen erfolgen vor Injektion (Nullwert) sowie nach 15 min und 30 min. Die Menge des entstandenen Abbauprodukts MEGX zeigt die Metabolisierungsleistung der Leber insbesondere des Cytochrom P-450 Systems an. Die Analyse erfolgt mittels eines TDx-Systems von Abbot oder einer High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC). Die Gesamttestdauer beträgt etwa eine Stunde.

## 2. Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit sollen die Resultate des MEGX-Test im Vergleich zu den histologischen Veränderungen des Lebertransplantates nach orthotoper Rattenlebertransplantation (ORLT) analysiert und dabei folgende Fragen beantwortet werden.

1. Hat der MEGX-Test bezüglich des Erkennens von Leberschäden eine valide Aussagekraft?
2. Kann man einen direkten Zusammenhang zwischen dem Grad der Leberschädigung und den MEGX-Werten erkennen?
3. Eignet sich der MEGX-Test als Transplantations-Nachsorgetest?
4. Können durch den MEGX-Test invasive Techniken wie Lebertransplantatbiopsien eingespart werden?
5. Welche Vorteile bietet der MEGX-Test gegenüber den anderen Leberfunktionstests?

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Versuchstiere

Für diese Versuchsreihe wurden männliche syngene Lewis-Ratten mit dem Genotyp RT1<sup>l</sup> und einem Gewicht von 200-300 Gramm aus der Zucht von Charles River genommen.

Die Tiere wurden bezogen von der Labortierbeschaffungsstelle Hannover.

Die Ratten wurden präoperativ in Gemeinschafts-, postoperativ in Einzelkäfigen gehalten und hatten Wasser und Altromin-Preßfutter zur unbegrenzten Verfügung. Vor und nach der Operation wurde auf eine Nahrungskarenz bei den Empfängertieren verzichtet.

Alle operativen und invasiven Maßnahmen sowie Versuche mit den Ratten sind von der Senatsverwaltung für Gesundheit des Land Berlin genehmigt worden. Es wurde streng nach den Richtlinien des Tierschutz verfahren. (Versuchsnummer 20/90)

### 3.2. Rattenleberexplantation und -transplantation

Die Transplantation wurde nach dem modifizierten Modell von Rudolf Steffen mit Cuff-Techniken und Rearterialisierung durchgeführt. (STEFFEN et al. 1989)

#### 3.2.1. Die Explantation der Spenderleber

Die Explantationen wurden unter 6-30x Vergrößerung mittels eines stereoskopischen Operationsmikroskops der Firma Wild-Heerbrugg mit mikrochirurgischem Instrumentarium in mikrochirurgischer Technik durchgeführt. Es wurde unter sauberen, aber nicht sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Spendertiere wurden unter Ätherinhalationsnarkose rasiert, die Bauchhaut desinfiziert und unter dem Operationsmikroskop vom Processus xyphoideus bis zur Blase median laparotomiert. Eine zusätzliche Inzision der Bauchdecke erfolgte von distal nach proximal v-förmig bis zum Rippenbogenrand unter Schonung der epigastrischen Gefäße. Die durchtrennte Haut und Bauchmuskulatur wurde auf der Unterlage fixiert. Das Xiphoid wurde mit einer kleinen Overholt-Klemme nach kranial retrahiert, der Dünndarm nach links neben das Tier ausgelagert und in eine feuchte Kompresse eingeschlagen um eine Austrocknung zu verhindern. Sämtliche Leberlappen wurden nun im Uhrzeigersinn mobilisiert. Mit der spitzen Schere erfolgte das saubere Durchtrennen des Ligamentum falciforme hepatis am Diaphragma, des Ligamentum triangulare am rechten Leberlappen und der Ligg. coronaria bis zur Einmündung der linken Vena subphrenica in die Vena cava inferior. Die subphrenische Vene wurde mit einer gebogenen Pinzette zirkulär freipräpariert, doppelt

mit 7-0 Seide ligiert und durchtrennt. Als anatomische Varianz mündet die V. diaphragmatica inferior extrem zwerchfellnah in die suprahepatische V. cava, so dass eine Separation nicht möglich ist und nicht erzwungen werden sollte, da hierbei die Gefahr eines Pneumothorax besteht, der in der Regel für das Tier letal ausgeht. Nun wurde die pars flaccida des Omentum minus und das Lig. hepatogastrale, welches den retroperitoneal liegenden Lobus caudatus am Magen fixiert, durchtrennt. Nach Mobilisation des Lobus caudatus wurde dieser von dorsal nach ventral geschlagen. Ein immer vorhandener Ast der linken Leberarterie aus der A. gastrica sinistra wurde doppelseitig mit 7-0 Seide ligiert und durchtrennt. Nach Eröffnung des Retroperitoneums im Bereich der infrahepatischen Vena cava wurde diese teils stumpf teils scharf zirkulär bis zur rechten Nierenvene freipräpariert. Anschließend konnte die rechte V. suprarenalis von medial her umfahren und einfach ligiert werden. Die Durchtrennung erfolgt erst bei der Hepatektomie. Es folgt nun die Präparation des Ligamentum hepatoduodenale. Um dieses übersichtlich und leicht gespannt darzustellen wurde der distale Magen großkurvaturseitig ebenfalls mit einer gebogenen Klemme gefasst und unter leichtem Zug nach links neben das Tier ausgelagert. Der Ductus choledochus wurde leberhilusfern im Ligament aufgesucht und zirkulär freipräpariert. Distal erfolgt die quere Eröffnung des Gallengangs mit einer Mikroschere, um den vorgefertigten etwa 8 mm langen, beiderseits abgeschrägten Teflonsplint aus einer 22-24 G Braunüle mit einer Mikropinzette intraduktal über die halbe Länge einzuführen. Die Fixierung des Splints in Gallengang erfolgte mit 8-0 Seide. Danach erfolgte die Durchtrennung des Gallengangs. Eine hiluswärts gerichtete Skelettierung des Gallengangs ist unbedingt zu vermeiden, um die Gallengangsdurchblutung nicht zu schädigen. Die Vena portae wurde ebenfalls nach stumpfen Entfernen des periportal Fettgewebes zirkulär bis zum Pankreasoberrand freipräpariert. Die V. coronaria ventriculi sowie die v. lienalis wurden mit 8-0 Seide doppelt ligiert und durchtrennt. Im nächsten Schritt erfolgte die Präparation der Leberarterie. Die A. hepatica communis wurde als einzige Arterie des Truncus coeliacus erhalten. Alle anderen Abgänge wurden sorgfältig mikrochirurgisch präpariert, mit 8-0 Seide doppelt ligiert und zwischen den Ligaturen durchtrennt. Zu ligieren sind hierbei die A. gastroduodenalis, die A. gastrica sinistra sowie die A. lienalis. Bereits nach Eröffnung des Retroperitoneums in diesem Bereich erkennt man den Truncus coeliacus deutlich an seiner Pulsation. Nach stumpfer Präparation erfolgte die Darstellung des Abgangsbereichs aus der Aorta.



Vor Beginn der hypothermen Perfusion wurde die infrahepatische Vena cava mit zwei weichen Gefäßklemmen geklemmt. Dicht über der leberfernen Klemme wurde die Vene durchtrennt, um genügend Strecke für die spätere Anastomosierung zu erhalten. Die Vena portae wurde ebenfalls am Pankreasoberrand mit einer armierten weichen Gefäßklemme verschlossen. Die portale Vorderwand wird vorsichtig angehoben und mit der spitzen Mikroschere quer eröffnet. Eine 16 G i.v. Kanüle, die in Verbindung mit dem Perfusionssystem stand, wurde bei geringem Fluss mit einem Druck von 25 cm Wassersäule in die Vena portae eingeführt. Um eine optimale Leberentblutung und Perfusatdrainage zu erreichen, wurde nach Eröffnen des Diaphragmas die intrathorakale Vena cava durchtrennt. Die portale Leberperfusion konnte nun mit maximaler Flussgeschwindigkeit und definiertem Perfusionsdruck erfolgen. Zur Unterbrechung der arteriellen Leberdurchblutung wurde der Truncus coeliacus sofort unter Belassen eines kleinen aortalen Patches durchtrennt. Über diesen Patch wurde zusätzlich die arterielle Perfusion mit einem Druck von 80 cm Wassersäule durchgeführt. Während der Perfusion wurde die suprahepatische Vena cava dicht unterhalb des Zwerchfells durchtrennt. An den gegenüberliegenden Ecken des Gefäßes wurden bereits jetzt zur späteren Anastomosierung mit der suprahepatischen Vena cava des Empfängertieres zwei 6-0 Nylonnähte vorgelegt. Nach Abschluss der etwa 3-4 Minuten dauernden Perfusion wurden nach Entfernen der Perfusionskanülen die Vena portae oberhalb der Klemme durchtrennt, ebenso die rechte V. suprarenalis. Die allseits freipräparierte Leber konnte dann vorsichtig mit der an der infrahepatischen Vena cava belassenen Klemme, ohne die Leber anfassen zu müssen, aus dem Situs entfernt werden. Das homogen perfundierte lehmfarbene Organ wurde dann in der auf 4° C gekühlten UW-Konservierungslösung gelagert.

### 3.2.2. Organkonservierung

Wir verwendeten die UW-Lösung (Tabelle 3) der Firma Du Pont de Nemours (Deutschland) GmbH Pharmazeutika, Bad Homburg. Der Perfusionsdruck für die portale Perfusion beträgt 25 cm Wassersäule bei einer Gesamtmenge von 30 ml. Für die Perfusion über die A. hepatica wurde ein Druck von 80 cm Wassersäule bei insgesamt 3 ml Perfusionslösung aufgewandt.

University of Wisconsin Lösung (UW)		
Pentafraktion (Hydroxylstärke)	50	g/l
Laktobionsäure	35,83	g/l
Kaliumphosphat, Kaliumhydrogenphosphat	3,4	g/l
Magnesiumsulfat, Hepahydrat	1,23	g/l
Raffinose Pentahydrat	17,83	g/l
Adenosin	0,136	g/l
Allopurinol	0,922	g/l
reduziertes Glutathion		
Kaliumhydroxid		
Natriumhydroxid	zur pH-Wert Einstellung (pH = 7,4)	
Wasser für Injektionszwecke	ad 1	l
Penicillin G	200000	iE
Alt Insulin	40	iE
Dexamethason	16	mg

*Tabelle 3 Zusammensetzung der UW-Konservierungslösung*

Carolina Rinse Lösung		
NaCl	115	mmol
KCL	5	mmol
CaCl	1,3	mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	mmol
MgSO <sub>4</sub>	1,2	mmol
Glycine	5	mmol
Nicardipine	2	µmol
Adenosin	200	µmol
Glucose	10	mmol
Fruktose	10	mmol
Insulin	100	IU/l
MOPS	20	mmol
Allopurinol	1	mmol
Glutathion	3	mmol
Desferrioxamine	1	mmol

*Tabelle 4 Zusammensetzung der Carolina Rinse Lösung*

Die Carolina Rinse Lösung (Tabelle 4) wurde gemäß der in der Tabelle aufgeführten Bestandteile als Sonderanfertigung aus der Apotheke des Virchow-Klinikums bezogen.

### 3.2.3 Die orthotope Rattenlebertransplantation

Nach Äthernarkose und Rasur der Bauchhaut erfolgt die mediane Laparotomie vom

Xiphoid bis zur Blase. Statt der v-förmigen Schnitterweiterung beim Spendertier wurden beim Empfänger zwei stumpfe Haken beidseitig unter die Rippenbögen eingesetzt und die Haut-Muskel-Lappen nach cranio-lateral gezogen. Die Präparation und Dissektion der linken subphrenischen Vene, aller Ligamente und der rechtsseitigen suprarenalen Gefäße wurden identisch zum Vorgehen beim Spendertier durchgeführt. Das gesamte Dünndarmpaket wurde ebenfalls nach links neben der Ratte ausgelagert und in feuchte Kompressen eingeschlagen. Die V. coronaria ventriculi wurden doppelt ligiert und durchtrennt. Die A. hepatica wurde lebernah ligiert und leberwärts durchtrennt. Die Arterie wurde dann bis hinter den Abgang der A. gastroduodenalis präpariert. Hierbei wurde ein stets vorhandener Lymphknoten im Bereich des Pankreasoberrandes in Richtung A. lienalis entfernt. Für die spätere Anastomose wurde der erweiterte y-förmige Abgang der A. gastroduodenalis gewählt. Der Gallengang wurde im Leberhilus knapp unterhalb der Bifurkation ligiert und durchtrennt. Der Empfängersitus ist danach bereit zum Ausklemmen der Gefäße mit anschließender Hepatektomie. Die infrahepatische Vena cava wurde oberhalb der rechten Nierenvene und die Vena portae unterhalb des Abgangs des verschlossenen Stumpfes der V. coronaria ventriculi geklemmt. Beide Gefäßklemmen wurden von rechts gesetzt. Die suprahepatische Vena cava wurde mit einer kleinen Satinsky-Klemme, die einen schmalen Saum des Diaphragmas mit erfasst, von links ausgeklemmt. Die suprahepatische Vena cava wurde dann lebernah durchtrennt. Die Vena portae wurde im frei präparierten Bifurkationsbereich abgesetzt. Als letztes Gefäß wurde die infrahepatische V. cava so durchtrennt, dass die Ligatur der suprarenalen Vene im Empfänger verbleibt. Die Leber konnte nun aus dem Situs entfernt werden. Die Ratte wurde um 180° gedreht, so dass der Kopf des Tieres zum Operateur zeigt. Während der anhepatischen Phase, welche mit dem Ausklemmen der Vena portae beginnt, kann aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit gegenüber des Narkosemittels in der Regel die Ätherkonzentration ohne die Gefahr des Erwachens deutlich reduziert werden. Die von der Konservierungslösung freigespülte Spenderleber wurde orthotop in den Situs gelegt. Die Anastomose der suprahepatischen Vena cava wurde mit den zwei bereits vorgelegten 6-0 Nylonnähten durchgeführt. Die korrespondierenden kurzen Enden der beiden Fäden wurden leicht angezogen, um die Gefäßwände aufzuspannen. Es folgte die in der rechten Ecke beginnende fortlaufende Hinterwandnaht in mikrochirurgischer Technik. Nach Fertigstellung der Hinterwandanastomose wurde der Faden mit dem kurzen Haltefaden der linken Ecke doppelt geknotet. Die Vorderwandnaht wurde in identischer Nahttechnik komplettiert.

Vor dem Knoten wurden zur Vermeidung einer Luftembolie nach Reperfusion eventuell verbliebene Luftblasen ausgespült. Das Tier wurde nun wieder in die normale Position gedreht. Die Empfänger- und Spenderportader wurden mit zwei 8-0 Echnähten approximiert. Die Hinterwand wurde von innen in fortlaufender Nahttechnik mit 3-4 Stichen adaptierend und spannungsfrei genäht und außen geknotet. Die Vorderwand wurde mit 4-5 Stichen ebenfalls fortlaufend genäht. Die portalvenöse Blutversorgung der Leber war wiederhergestellt und konnte freigegeben werden. Gleichzeitig wurde die Satinsky-Klemme von der suprahepatischen Vena cava entfernt. Wenn die anhepatische Phase 20 Minuten nicht überschreitet, ist mit einer schnellen, homogenen Reperfusion zu rechnen. Zu diesem Zeitpunkt, also bei einsetzender Leberfunktion, musste die Narkose wieder vertieft werden. Es folgte die Anastomose der infrahepatischen Vena cava in der für die Vena portae beschriebenen Technik, ebenfalls mit einer 8-0 Nylonnaht. Nach Freigabe des Blutflusses steht das gesamte venöse Blut wieder zur Verfügung, was sich in einer erhöhten kardialen Auswurfleistung und einer signifikanten Verbesserung der interstinalen Durchblutung äußert. Die Empfängerarterie wurde mit einem Mikroclip an ihrer Basis verschlossen und unter stärkerer mikroskopischer Vergrößerung proximal von anhängendem Bindegewebe befreit. Das Gefäß wurde im Abgangsbereich der A. gastroduodenalis quer unter Bildung eines trichterförmigen Lumens abgesetzt. Der Gefäßstumpf wurde mit Kochsalzlösung ausgespült und anschließend ein 10-0 Haltefaden am Rand der Arterie vorgelegt. Der Gefäß-Cuff wurde aus einer 24 G i.v. Braunüle gefertigt. Der 10-0 Haltefaden wurde mit den Gefäßenden durch den Cuff gezogen und umgeschlagen. Die Position des Gefäßes um den Cuff wird mit einer 8-0 Ligatur fixiert. Die Spenderarterie wurde nun ebenfalls über den Cuff gezogen und mit einem 8-0 Faden lagefixiert. Nach Abnahme der Klemme ist die Rearterialisierung abgeschlossen. Abschließend wurde die Gallengangsanastomose gefertigt, indem der im Spendergallengang liegende Splint in den Empfängergallengang eingeführt wurde. Die beiden Gallengänge konnten dann mit zwei periduktal gestochenen 8-0 Nähten vereinigt werden. Vor dem Bauchdeckenverschluß wurde das Abdomen sorgfältig mit warmer Kochsalzlösung gespült, um Blutgerinnsel und Galleflüssigkeit auszuspülen. Eine zweischichtige fortlaufende Naht der Bauchwand und Haut mit resorbierbarem Nahtmaterial beendete die Transplantation. Die Tiere wurden in einen Einzelkäfig gelegt und bis zum vollständigen Erwachen mit Infrarotlicht Typ Philipps 150 W erwärmt. Die Tiere hatten nach der Operation Futter und Wasser im Käfig ad libitum.

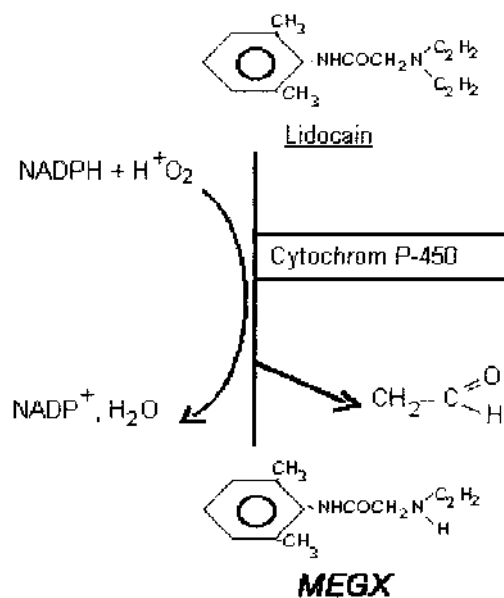
### 3.3. Der MEGX-Test

Für die Durchführung des MEGX-Test wurde Lidocain 2% (Braun Melsungen) verwendet. Die Blutentnahmen erforderten einen Volumenausgleich von ca. 2-3 ml. Zum Ausgleich wurde eine hydroxyethylstärkehaltige Infusionslösung 60g/l (Plasmasteril® der Firma Fresenius in Oberursel /Ts) eingesetzt.

#### 3.3.1. Lidocain

Lidocain ist ein 1948 eingeführtes Medikament, welches in der Klinik als Lokalanästhetikum und Antiarrhythmikum gebräuchlich ist. Es gehört chemisch zu den tertiären Aminen. Die Substanz ist ein gelbliches Pulver, das zwischen 68 und 69°C schmilzt. Der IUPAC-Name lautet 2-Diethylamino-(2,6-dimethylacetanilid). Lidocain ist als schwache Base nur in Form eines sauren Salzes wasserlöslich. (Lidocainhydrochlorid) (Ferner löst sich Lidocain in Ethanol und Chloroform. Die Substanz ist in Ether unlöslich und praktisch geruchlos. In der medizinischen Anwendung wird Lidocain als Lidocainhydrochlorid (z.B. Xylocain®) in flüssiger Lösung angeboten.) Lidocain wird in der Leber durch Monooxygenasen zu MEGX verstoffwechselt. (Abbildung 2)

Abbildung 2 Der Metabolisierungsschritt von Lidocain zu MEGX

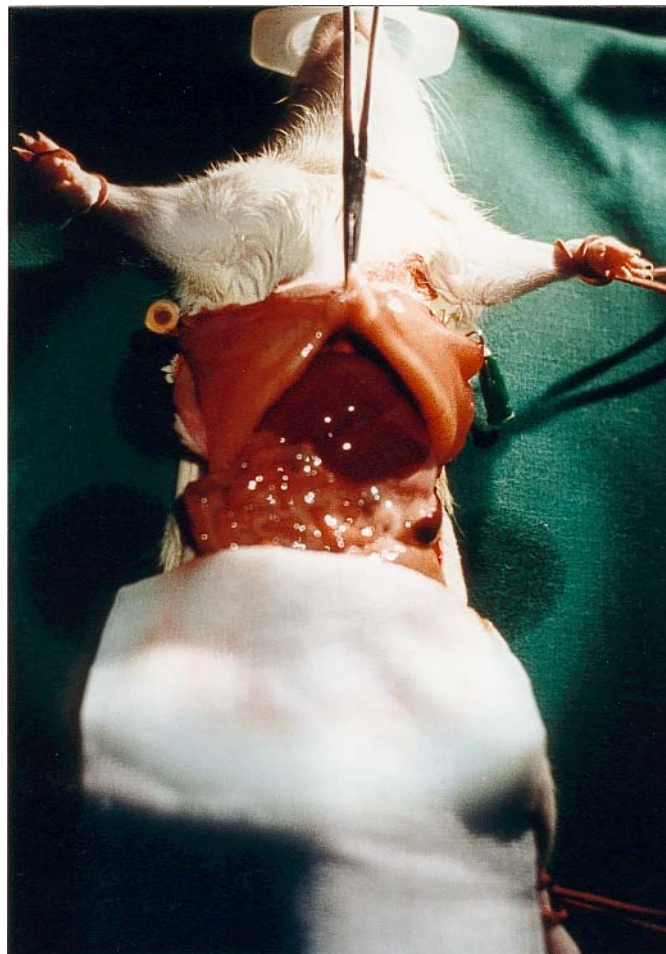


### 3.3.2. Technische Durchführung des MEGX-Test

Am zweiten oder sechsten postoperativen Tag erfolgte die Versuchsdurchführung. Für die Durchführung des MEGX-Test erfolgte die Anästhesie der transplantierten Ratten per Ätherinhalationsnarkose. Die Ratten wurden im narkotisierten Zustand gewogen um das Ausgangsgewicht für die zu applizierende Menge Lidocain zu ermitteln. Die Operation wurde unter 6-30x Vergrößerung mittels eines stereoskopischen Operationsmikroskops der Firma Wild-Heerbrugg mit mikrochirurgischem Instrumentarium in mikrochirurgischer Technik analog der Explantation durchgeführt. Es wurde unter sauberen, aber nicht sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Spendertiere wurden unter Ätherinhalationsnarkose rasiert, die Bauchhaut desinfiziert und unter dem Operationsmikroskop vom Processus xyphoideus bis zur Blase median in der Transplantationsnarbe laparotomiert. Bei den Tieren war schon eine deutliche Wundheilung zu erkennen. Beiderseits wurde zusätzlich die Bauchdecke von distal nach proximal v-förmig bis zum Rippenbogenrand unter Schonung der epigastrischen Gefäße eingeschnitten. (Photo 1) Die durchtrennte Haut und Bauchmuskulatur wurde auf der Unterlage fixiert. Das Xiphoid wurde mit einer kleinen Overholt-Klemme nach kranial retrahiert. Der Dünndarm wurde nach links neben das Tier ausgelagert und in eine feuchte Kompresse eingeschlagen um eine Austrocknung zu verhindern. Sämtliche Leberlappen wurden nun im Uhrzeigersinn mobilisiert. Aufgrund der vorausgegangenen ORLT war der Situs übersichtlich und man konnte zügig zur Eröffnung des Retroperitoneums im Bereich der infrahepatischen Vena cava schreiten. Diese wurde teils stumpf teils scharf zirkulär bis zur rechten Nierenvene freipräpariert. Die Punktion der V. cava erfolgte mit einer kurzen mit Kochsalzlösung entlüfteter Butterfly-Kanüle mit 0,2 mm Durchmesser (Abbott Sligo, Irland) infrarenal. (Photo 2) Die Fixierung der Nadel erfolgte mit einem 10-0 Haltefaden für den Zeitraum der Versuchsdurchführung. Über diesen Zugang erfolgte die Versuchsdurchführung. Dem Tier wurde zuerst 1,5 ml Nativblut für die Bestimmung des Hämatokritwertes und des Nullwerts entnommen. Dann wurde Lidocain (2 mg/kg Körpergewicht) langsam über eine Minute injiziert. Nach 15 Minuten erfolgte die zweite Blutentnahme. Bei dieser Entnahme wurde 1,0 ml Blut benötigt. Nach 30 Minuten wurde die dritte und letzte Blutentnahme mit ebenfalls 1,0 ml Blut durchgeführt. Das Blut wurde jeweils sofort nach Gewinnung in Eppendorfcups gefüllt und 10 Minuten mit 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde dekantiert und in anderen ebenfalls beschrifteten Eppendorfcups (Versuchstiernummer,

Entnahmezeitpunkt -->T-0, T-15, T-30) in flüssigen Stickstoff bei -187°C schockgefroren. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte dann bei -70°C. Es folgt nun die Transplantathepatektomie und die Tötung der Tiere. Für die histologische Auswertung wurde der rechte Leberlappen in Formalin fixiert.

*Photo 1 Blick in den Rattensitus*



### **3.3.2.1. Der Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay (FPIA)**

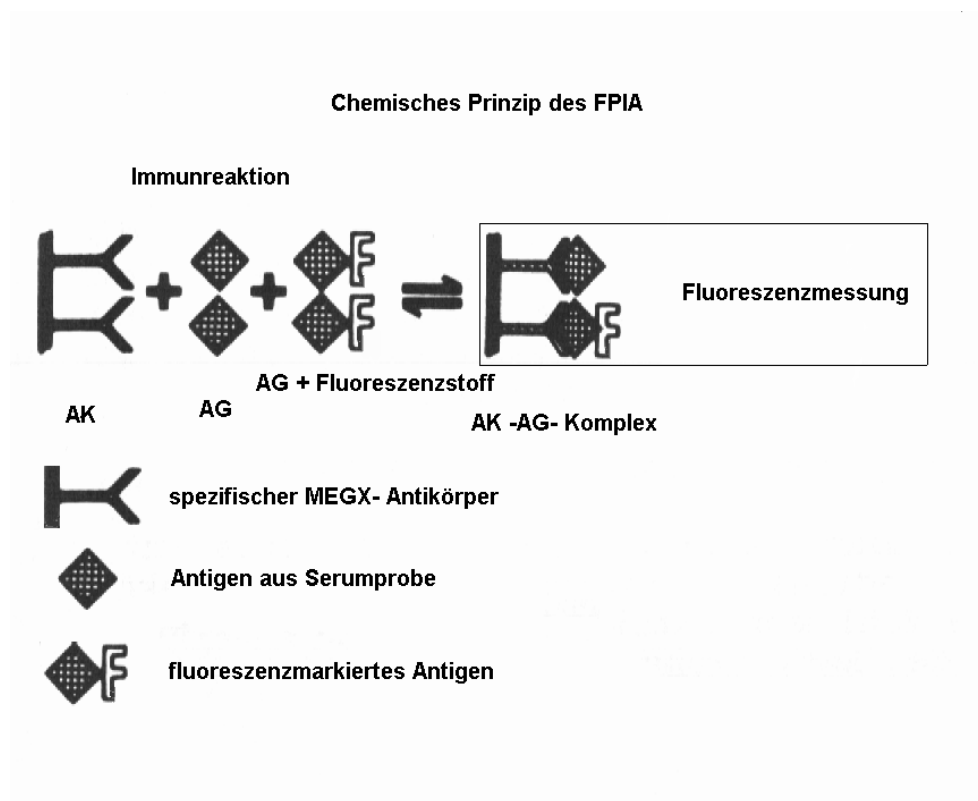
Die eingefrorenen Plasmaproben wurden aufgetaut und mittels Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay (FPIA) an einem TDx-Prozessor der Abbott Labors (Abbildung 4) mittels eines MEGX-Test-Kits auf MEGX analysiert.

Funktionsweise des TDx-Systems:

Licht verschiedener Wellenlängen und Farben wird von einer Wolfram-Halogenlampe emittiert. Die räumliche Ausrichtung ist rein zufällig. Mittels eines vor dieser Lichtquelle

angebrachten Interferenzfilter wird erreicht, dass nur blaues Licht der Wellenlängen 481-489 nm passieren kann. Um dieses blaue Licht auf einer einzigen Ebene zu polarisieren wird es anschließend durch einen Flüssigkristall-Polarisator geleitet. Das auf einer Ebene polarisierte blaue Licht trifft auf den Versuchsansatz bzw. den Fluoreszenzfarbstoff, wodurch dieser angeregt wird. Nach dieser Anregung kehrt der Fluoreszenzfarbstoff wieder in den Normalzustand zurück und emittiert dabei grünes Licht der Wellenlängen 525-550 nm. Wenn der Fluoreszenzfarbstoff an ein großes Antikörpermolekül bindet, so dass er nicht mehr frei drehen kann, dann schwingt das emittierte grüne Licht in der gleichen Ebene wie das anregende blaue Licht, das bedeutet, dass die Polarisation beibehalten wird. Wenn eine freie Rotation des Fluoreszenzfarbstoffs möglich ist, weil das kleine Molekül des Tracers nicht gebunden wird, so geht die Polarisation verloren, da das emittierte grüne Licht auf einer anderen Ebene als das anregende blaue Licht schwingt. Aufgrund der Rotationseigenschaften von Molekülen in Lösung verhält sich der Polarisationsgrad direkt proportional zur Molekülgröße. Die Polarisation nimmt mit der Molekülgröße zu.

Abbildung 3 Chemisches Prinzip des Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assays





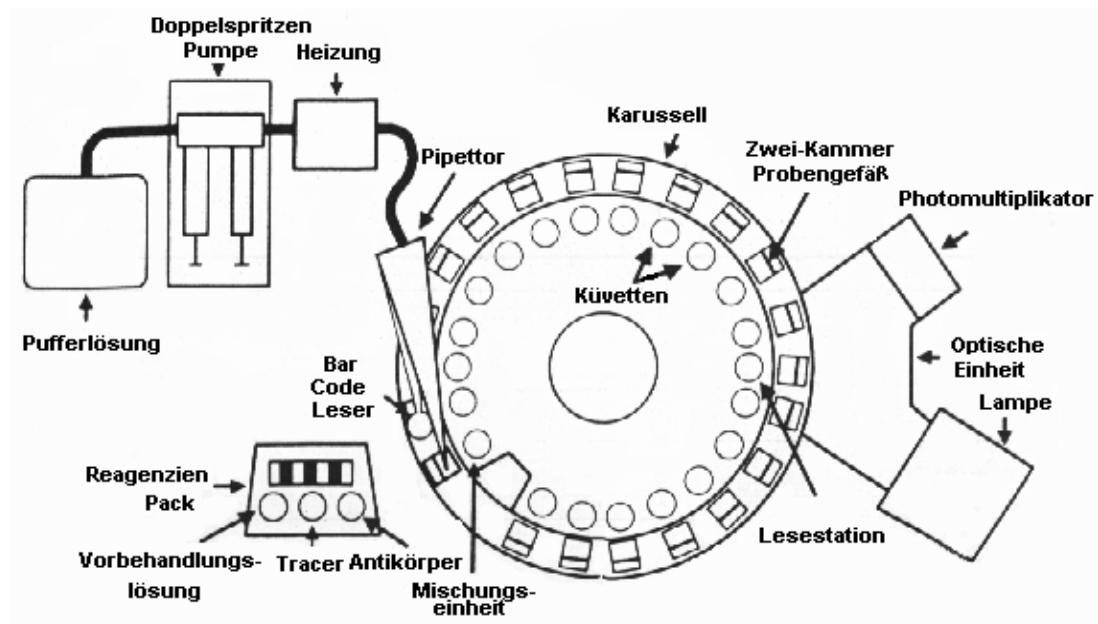
Beim TDx-System kommt eine Immunoassaymethode mit kompetitiver Bindung, bei der mit Tracer markiertes Antigen und Antigen der Probe um Bindungsstellen der Antikörpermoleküle konkurrieren, zum Einsatz. Die Bestandteile dieser kompetitiven Bindungsreaktion sind: der Antikörper, das Antigen in der Probe und das mit Fluorescein markierte Antigen. (Tracer-Antigen-Komplex) (Abbildung 3) Je mehr Tracer-Antigen-Komplex an das sehr große Antikörpermolekül gebunden wird, umso weniger Tracer-Antigen-Komplexe bleiben in der Lösung zurück.

Aus einer hohen Konzentration von gebundenen Tracer in der Reaktionsmischung resultiert eine hohe Polarisierung und umgekehrt.

Die genaue Beziehung zwischen Polarisierung und Konzentration der zu untersuchenden Substanz (MEGX) wird durch Bestimmung der Polarisationswerten von Kalibratoren mit bekannten Konzentrationen hergestellt. (JOLLY et al. 1981 ; DANDLIKER et al. 1973 ; CHAN and SMITH 1984 ; CHEN and POTTER 1992)

Abbildung 4: Das TDx-System

### Das TDx-System:



(Abb. Aus JOLLY et al. 1981)

Die Kalibrationskurve für MEGX beträgt 0 bis 250 µg/l und ist dem zu erwartenden Werten angepasst. Die Sensitivität beträgt 15 µg/l. Die Kreuzreaktivität zu Lidocain

beträgt weniger als 1%. (LITTLEFIELD et al. 1988)

Alle Proben wurden mit einer Charge durchgemessen und jedem Messzyklus (T-0, T-15, T-30) sowie jedem Karussell wurde eine Probe mit bekannter Konzentration von 100 µg/l beigelegt. Die Kontrollproben waren immer im Referenzbereich. (100,20 – 109,65 µg/l)

## **3.4. Asservierung histologischer Proben**

### **3.4.1. Aufarbeitung der Histologie**

Nach Beendigung des MEGX-Tests wurden dem toten Tier die Leber und weitere Organe (Nieren, und Herz) entnommen. Von der Leber wurde standardisiert der suprarenale Lappen abgetrennt und in 10 % Formalinlösung in beschrifteten Reagenzgläsern (Versuchstiernummer, Gewebeart) bis zur Auswertung fixiert.

#### **3.4.1.1. Färbungen und Auswertung**

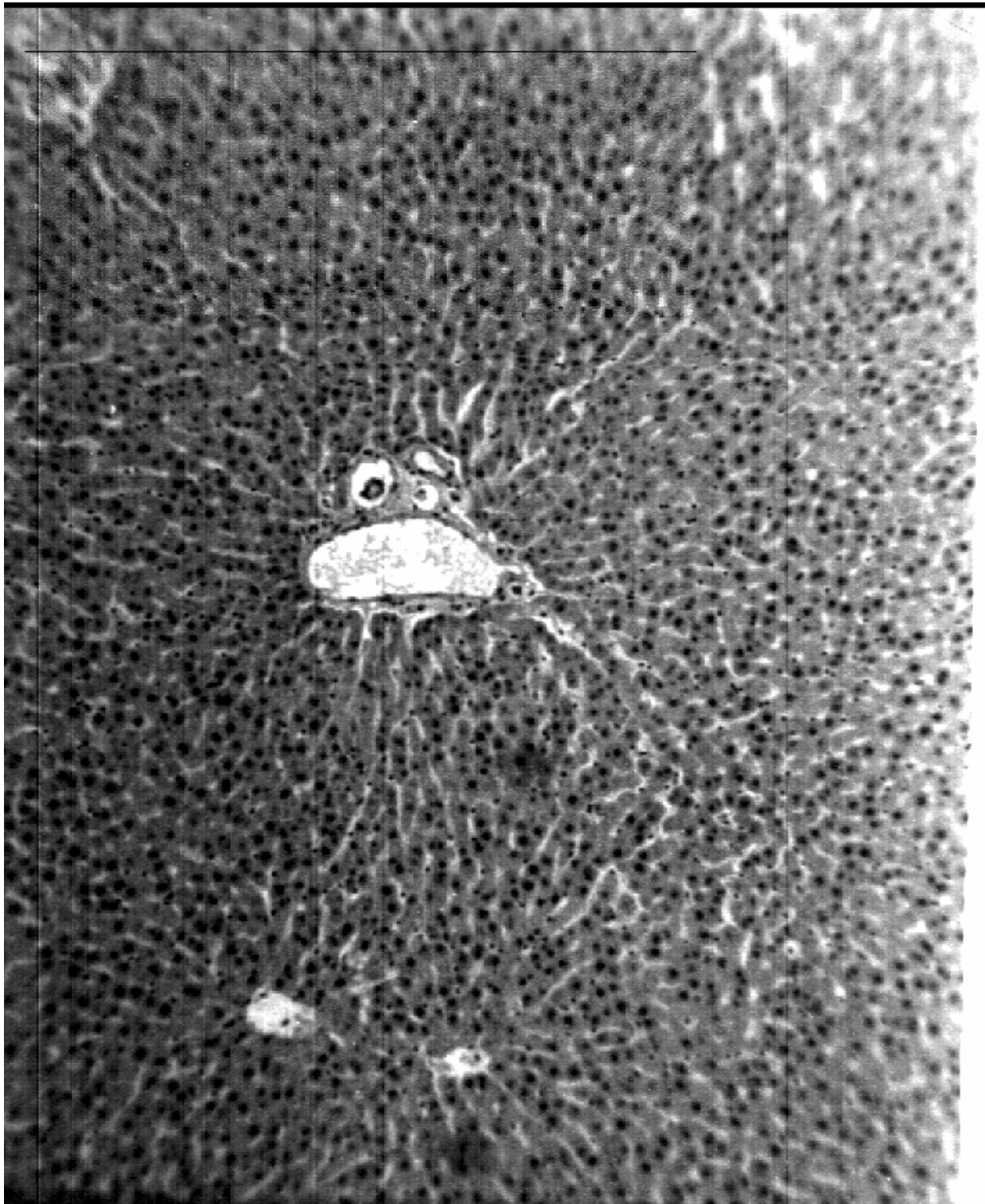
Von den in Formalin asservierten suprarenalen Leberlappen wurden Stücke abgetrennt und durch verschiedene Alkoholbäder entwässert und in Paraffinblöcken eingegossen. Von diesen Blöcken wurden mittels eines Schlittenmikrotoms 2-4 µm dicke Schnitte genommen und auf beschriftete Objektträger plaziert. Die beschichteten Objektträger wurden mittels Hämatoxilin-Eosin Färbung (H&E) gefärbt, da die Leberzellschädigung mit der HE-Färbung gut beurteilt werden kann. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch bei 200 bis 1000-facher Vergrößerung unter Anleitung eines Pathologen. (Dr. Thalmann Pathologisches Institut des Virchow-Klinikum) Die lichtmikroskopisch sichtbaren Schädigungen der Hepatozyten wurden gemäß der Klassifikation von R. Steffen eingeteilt. (Steffen et al. 1988) Die Einteilung bezieht sich auf drei graduell beschreibbare histologische Veränderungen des Lebergewebes.

Im **Grad 1** der Veränderungen erkennt man normales Lebergewebe oder einen leichten Konservierungsschaden, erkenntlich an vereinzelt nekrotische Hepatozyten, Zellschwellungen und Vacuolisierungen von Hepatozyten. (Photo 2)

Das Bild des zweiten Schädigungsgrad (**Grad 2**) zeigt einen mittelgradigen Hepatozytenhydrops. Die Veränderungen sind überwiegend auf die Portalfelder beschränkt. Dort finden sich nekrotische Hepatozyten und nekrotisches Gewebe. Es zeigt sich das Bild eines mittleren Konservierungsschaden. (Photo 3)

Bei dem dritten Schädigungsgrad (**Grad 3**) dominieren eine schwere Hepatozytenzerstörung in den Periportalfeldern und auf den gesamten Leberlappen übergreifende nekrotische Areale. (Photo 4)

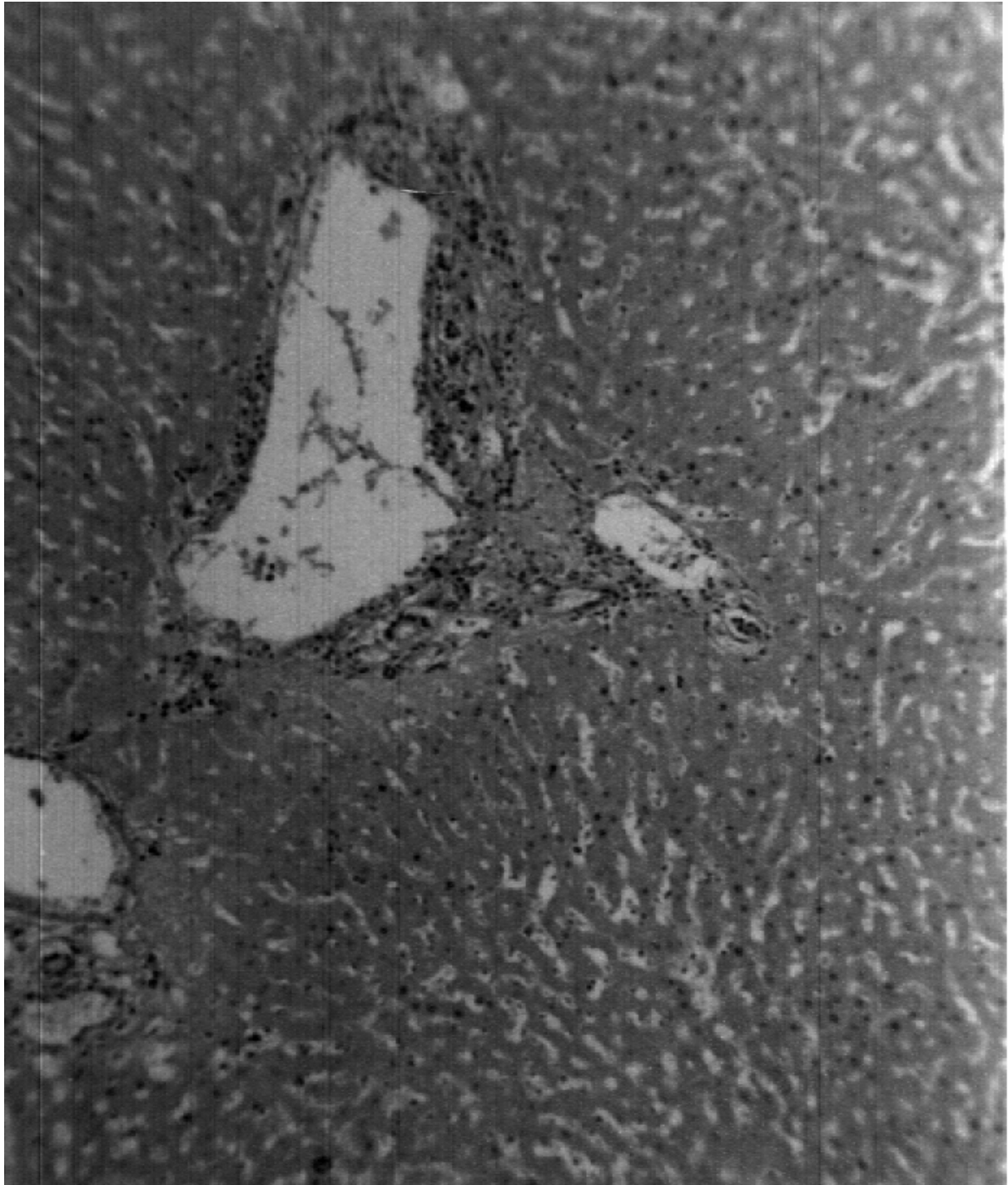
Photo 2 Leberhistologie Schädigungsgrad 1



**Leberschädigung Grad 1:**

Normale Leber oder leichter Konservierungsschaden, vereinzelt nekrotische Hepatozyten, Zellschwellung, Vakuolisierung

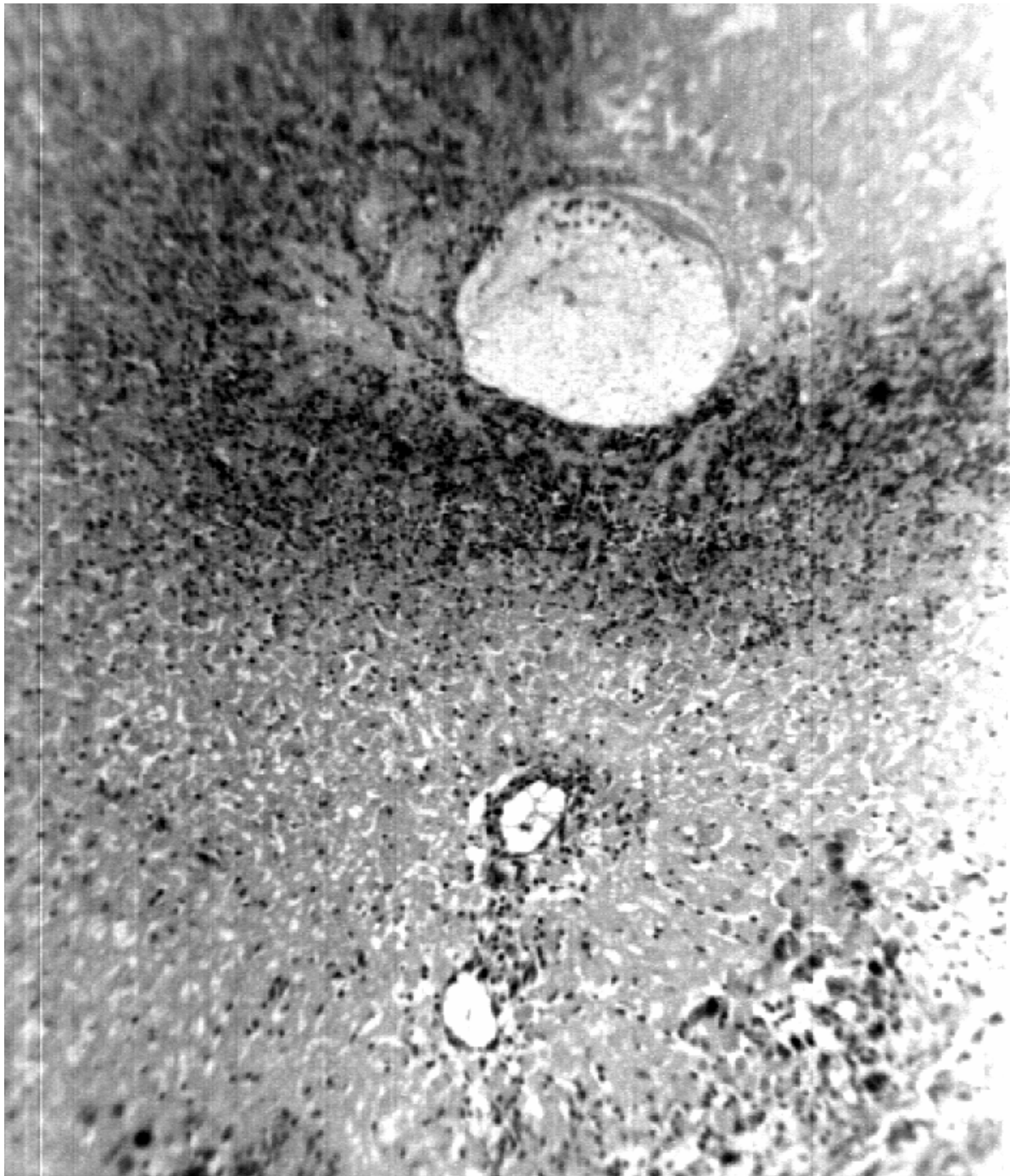
*Photo 3 Leberhistologie Schädigungsgrad 2*



**Leberschädigung Grad 2:**

Mittelgradiger Hepatozytenhydrops. Die Veränderungen sind überwiegend auf die Portalfelder beschränkt. Es finden sich dort nekrotische Hepatozyten und nekrotisches Gewebe.

*Photo 4 Leberhistologie Schädigungsgrad 3*



**Leberschädigung Grad 3:**

Ausgeprägter Konservierungsschaden, schwere Leberzellzerstörung in den Portalfeldern und auf den gesamten Lappen übergreifende nekrotische Areale.

### 3.5. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test eingesetzt. Um den Test einsetzen zu können muss erst pro Stichprobe der Median, die Standardabweichung, das Minimum und das Maximum ermittelt werden. Es wurden jeweils pro Tier die T15 und T-30-Werte zu der histologischen Klassifikation (Schadigungsgrade 1 bis 3) zugeordnet. Wir gehen von der Vermutung aus, dass die MEGX-Werte der Tiere mit dem Schadigungsgrad 1 sich in der Höhe derer der Schadigungsgrad 2 unterscheiden. Die gleiche Annahme gilt für den Vergleich Schadigungsgrad 2 mit Schadigungsgrad 3. Diese Hypothese soll statistisch gesichert werden. Wir formulieren folgende für alle Schadigungsgrade und Probenzeitpunkte einsetzbare Nullhypothese:

$H_0$ : Die Zufallsvariante hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariante ist in der Grundgesamtheit (Histo1) stochastisch größer als in Histo 2.

Aus dem Ergebnis der Randsummen wird die Prüfgröße U berechnet.

$$U_1 = n_1 \times n_2 + [n_1(n_1 + 1) / 2] - R_1$$
$$U_2 = n_1 \times n_2 + [n_2(n_2 + 1) / 2] - R_2$$

Wobei n ... Stichprobengröße und R ... Ranks darstellen.

Nun vergleichen man die U-Werte mit der Tabelle unter Rücksichtnahme auf die beiden Stichprobengrößen  $n_1$  und  $n_2$  sowie des entsprechenden Konfidenzintervalls (Signifikanzlevel: **0.01** od. **0.05**).

1. Wenn  $U > U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Annahme von  $H_0$
2. Wenn  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$

Ist der kleinere der U-Werte gleich oder kleiner als der tabellierte Wert, so ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben gegeben. (Die Nullhypothese kann verworfen werden). (CLAUß G. et al.)

Die statistischen Berechnungen wurden unter der Aufsicht des Herrn Unger (Statistiker des Virchow-Klinikums Berlin) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Von 148 transplantierten Ratten überlebten 78 Tiere. An chirurgischen Komplikationen verstarben 12 Tiere. Bei 21 Tieren war die Durchführung des MEGX-Test nicht möglich oder die Proben waren nicht analysierbar. An 57 überlebenden Ratten wurde der MEGX-Test sowie histologische Untersuchungen an der transplantierten Leber durchgeführt. Zur Bearbeitung des Themas wurde bei jedem überlebenden transplantiertem Versuchstier unabhängig der kalten Ischämiezeit der MEGX-Test durchgeführt. Nach Tötung der Tiere wurden von der transplantierten Leber der rechte Leberlappen für die histologische Aufarbeitung resiziert und in Formalin asserviert. Die Auswertung der Leberhistologie erfolgte einfachblind in Unkenntnis der MEGX-Testwerte. Die Analyse der Blutproben auf MEGX erfolgte ebenfalls einfachblind in Unkenntnis des histologischen Status des rechten Leberlappens. Im Anschluss wurden anhand der Tiernummern die Histologie und der MEGX-Wert zusammengeführt.

Es erfolgte eine Gruppeneinteilung nach den histologischen Schädigungsgraden 1 bis 3

### 4.1. Histologische Untersuchungsergebnisse

Die histologische Untersuchung der HE gefärbten Leberschnitte ergab ein indifferentes Bild. Man erkennt normales Lebergewebe oder einen leichten Konservierungsschaden, erkenntlich an vereinzelt nekrotische Hepatozyten, Zellschwellungen und Vacuolisierungen von Hepatozyten. Weitergehende Schädigungen erkennt man an einem mittelgradigen Hepatozytenhydrops. Diese Veränderungen sind überwiegend auf die Portalfelder beschränkt. Dort finden sich nekrotische Hepatozyten und nekrotisches Gewebe. Dieses Bild wird als mittleren Konservierungsschaden eingestuft. Bei dem dritten Schädigungsgrad dominieren eine schwere Hepatozytenzerstörung in den Periportalfeldern und auf den gesamten Leberlappen übergreifende nekrotische Areale. Von 57 histologisch aufgearbeiteten Leberschnitten waren 18 Lebern mit Veränderungen gemäß Grad 1, bei 23 Lebern zeigten sich Schäden des Grades 2 und bei 16 Lebern waren ausgeprägte Konservierungsschäden mit großen nekrotischen Arealen gemäß Grad 3 zu erkennen. Es wurden Gruppen nach Grad der histologischen Veränderungen Grad 1 bis Grad 3 gebildet



## 4.2. Laborchemische Ergebnisse MEGX-Test

Bei der Betrachtung aller Werte lassen sich keine Aussagen über eine spezielle Verteilung der MEGX-Werte machen. Es lässt sich kein systematischer Fehler entdecken, alle Tiere vertrugen die Lidocainbelastung von 2 mg/kg/Körpergewicht ohne Probleme, kein Tier verstarb innerhalb der Testdurchführung. Die nach den histologischen Grad der Schädigung gebildeten Gruppen wurden nun jedem Tier die MEGX-Werte t-0, t-15 und t-30 zugeordnet.

Tier	t-0 (µg/l)	t-15 (µg/l)	t-30 (µg/l)
14	7,41	248,37	325,24
17	3,62	258,00	427,72
48	3,04	256,75	387,30
53	3,61	213,89	384,76
55	6,84	140,96	245,56
61	3,18	168,88	259,48
76	6,54	109,09	204,17
77	5,36	211,55	376,92
86	6,74	149,30	169,08
88	5,00	140,42	240,20
91	5,54	119,20	218,60
92	2,46	120,33	213,32
118	3,60	104,56	215,69
135	3,31	265,8	476,12
140	3,84	114,6	309,04
145	2,91	184,72	210,08
147	2,65	93,04	198,59
148	2,53	68,30	164,23
n=18			

*Tabelle 5: MEGX-Werte der histologischen Leberschädigung Grad 1*

In Tabelle 5 sind die MEGX-Werte der Gruppe 1 (Grad 1 der histologischen Schädigung) zugeordnet. In dieser Gruppe befinden sich 18 Tiere.

Tier	t-0 (µg/l)	t-15 (µg/l)	t-30 (µg/l)
5	4,15	115,4	163,8
9	5,28	124,68	185,52
10	4,01	125,36	183,11
11	3,91	73,02	86,40
12	4,60	67,67	117,72
16	4,95	21,72	40,47
21	8,36	160,15	274,32
26	3,56	69,34	99,75
35	4,72	75,52	157,36
42	3,70	48,82	105,24
84	3,81	38,92	68,56
87	3,29	107,66	217,00
93	3,54	92,16	141,41
98	2,35	56,85	110,70
105	6,80	104,89	243,46
107	2,68	68,86	125,36
108	3,13	41,66	77,20
113	5,62	37,82	70,71
117	3,75	36,52	73,94
121	13,20	36,26	54,02
122	6,82	135,56	284,80
137	4,16	138,26	223,64
146	3,93	75,51	122,95
n=23			

*Tabelle 6: MEGX-Werte der histologischen Leberschädigung Grad 2*

In Tabelle 6 sind die MEGX-Werte der Gruppe 2 (Grad 2 der histologischen Schädigung) zugeordnet. In dieser Gruppe befinden sich 23 Tiere.

Tier	t-0 (µg/l)	t-15 (µg/l)	t-30 (µg/l)
4	6,44	13,27	20,39
8	3,68	45,87	98,93
13	10,05	40,45	98,86
33	8,51	69,26	133,86
39	4,74	52,42	74,53
65	5,23	22,93	22,30
68	6,09	35,24	72,23
78	5,41	47,15	94,61
83	7,65	56,36	56,56
94	4,81	18,25	38,47
103	3,69	41,52	83,13
104	4,32	30,25	51,39
106	5,36	34,02	55,28
119	7,08	22,97	37,55
120	6,48	47,52	105,21
130	4,38	22,10	37,24
n=16			

*Tabelle 7: MEGX-Werte der histologischen Leberschädigung Grad 3*

In Tabelle 7 sind die MEGX-Werte der Gruppe 3 (Grad 3 der histologischen Schädigung) zugeordnet. In dieser Gruppe befinden sich 16 Tiere.

### 4.3. Statistische Auswertung

Diese Gruppen werden für die statistische Auswertung noch jeweils nach dem Zeitpunkt der Blutentnahme unterteilt. (t-15 min., t-30 min.)

Mit dem Mann-Whitney-Test, ein nichtparametrischer Test sollte herausgefunden werden ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen erreichtem MEGX-Testwert und dem Grad der histologischen Schädigung besteht. Die folgenden Tabelle zeigen den Median, die Standardabweichung, das Minimum und das Maximum zum Zeitpunkt t-15 (Tabelle 10) und zum Zeitpunkt t-30. (Tabelle 11)

MEGX-Wert in $\mu\text{g/l}$ 15 min. nach Lidocaingabe zu den histologischen Graden 1-3					
Histograd	Anzahl Proben	Median	Std. Abweichung	Minimum	Maximum
1	18	184,787117	63,47943	68,3	265,76
2	23	80,54696	39,23088	21,27	160,15
3	16	37,47375	15,41306	13,27	69,26

*Tabelle 8 MEGX-Werte in  $\mu\text{g/l}$  15 min. nach Lidocaingabe zu den histologischen Graden 1-3*

Es zeigt sich in Gruppe 1 bei 18 Proben fünfzehn Minuten nach Lidocaingabe ein Median von 184,8  $\mu\text{g/l}$  MEGX, bei einer Standardabweichung von 63,5  $\mu\text{g/l}$ . In Gruppe 2 liegt die der Median bei 80,5  $\mu\text{g/l}$  und die Standardabweichung bei 39,2  $\mu\text{g/l}$ . In der Gruppe mit dem histologischen Schädigungsgrad 3 liegt der Median bei 37,5 und die Standardabweichung bei 15,4  $\mu\text{g/l}$ .

MEGX-Wert in µg/l 30 min. nach Lidocaingabe zu den histologischen Graden 1-3					
Histograd	Anzahl Proben	Mittelwert	Std. Abweichung	Minimum	Maximum
1	18	279,2278	95,04199	164,23	476,12
2	23	140,3248	70,87421	40,47	284,8
3	16	67,53375	32,95892	20,39	133,86

*Tabelle 9 MEGX-Wert in µg/l 30 min. nach Lidocaingabe zu den histologischen Graden 1-3*

Es zeigt sich in Gruppe 1 dreißig Minuten nach Lidocaingabe ein Median von 279,2 µg/l MEGX, bei einer Standardabweichung von 95 µg/l. In Gruppe 2 liegt die der Median bei 140,3 µg/l und die Standardabweichung bei 70,9 µg/l. In der Gruppe mit dem histologischen Schädigungsgrad 3 liegt der Median bei 67,5 und die Standardabweichung bei 32,9 µg/l.

Der Vergleich der Mediane der einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt t-15 und t-30 zeigt schon eine Differenz in der sich die Gruppen unterscheiden. (Graphik 1) Um nun eine genaue Aussage machen zu können ob dieser sichtbare Unterschied auch signifikant ist erfolgte eine Auswertung durch den nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test.

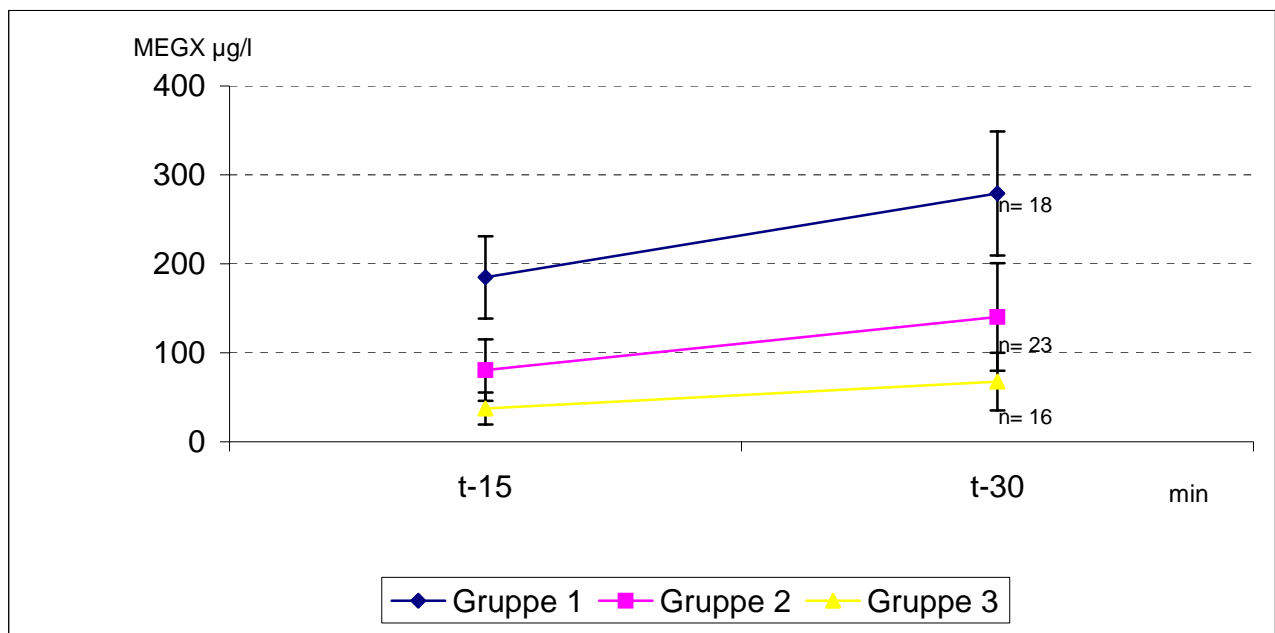


Diagramm 1 Darstellung der Gruppenmediane

Es sind die Mediane der jeweiligen Gruppen aufgetragen. In der Gruppe 1 beträgt die Standardabweichung bei t-15 = 63,47 und bei t-30 = 95,04. In der Gruppe 2 beträgt die Standardabweichung bei t-15 = 39,23 und bei t-30 = 70,87. In der Gruppe 3 beträgt die Standardabweichung bei t-15 = 15,41 und bei t-30 = 32,95.

Die statistische Auswertung der Stichproben Gruppe 1 mit Gruppe 2 erfolgte unter  $H_0$ : Die Zufallsvariante hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariante ist in der Grundgesamtheit (Histo1) stochastisch größer als in Histo 2.

Es ergab sich eine Rangsumme von 530 im Vergleich der Gruppen 1 und 2 bei  $T=15$ . Daraus errechnete sich ein  $U$  von 3.99. Dieser Wert wurde verglichen unter der Maxime:

Wenn  $U > U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Annahme von  $H_0$ .

Wenn  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$ .

Der Vergleich ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 das  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  ist und damit die Nullhypothese zurückgewiesen werden muss. (Tabelle 10)

Das Ergebnis lautet: Zum Zeitpunkt t-15 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben. Der MEGX-Test kann zu diesem Zeitpunkt in seinen Werten die histologischen Befunde bestätigen.

MEGX-Wert 15 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 1 mit MEGX-Wert 15 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 2	
Variablen:	Probengröße
T -15, Histo = 1	18
T -15, Histo = 2	23
Rangsumme	530
T	359
Näherung	
Mittelwert von T	207
Standardabweichung von T	38,06573
U	3,993039
Prob ( $\hat{\sigma} \geq 3.993$ ) = p	0,0001

Tabelle 10 Statistische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 2 zum Zeitpunkt t-15

Die MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=15' in der histologischen Schädigungsgruppe 1 wurden mit den MEGX-Testwerten zum Zeitpunkt t=15' in der histologischen Schädigungsgruppe 2 verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Die statistische Auswertung der Stichproben Gruppe 1 mit Gruppe 3 erfolgte unter  $H_0$ : Die Zufallsvariable hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariable ist in der Grundgesamtheit (Histo1) stochastisch größer als in Histo 3.

Es ergab sich eine Rangsumme von 458 im Vergleich der Gruppen 1 und 3 bei T=15. Daraus errechnete sich ein U von 4,93. Dieser Wert wurde verglichen unter der Maxime:

Wenn  $U > U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Annahme von  $H_0$ .

Wenn  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$ .

Der Vergleich ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 das  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  ist und damit die Nullhypothese zurückgewiesen werden muss. (Tabelle 11)

Das Ergebnis lautet: Zum Zeitpunkt t-15 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben. Der MEGX-Test kann zu diesem Zeitpunkt in seinen Werten die histologischen Befunde bestätigen.

MEGX-Wert 15 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 1 mit MEGX-Wert 15 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 3	
Variablen:	Probengröße
T -15, Histo = 1	18
T -15, Histo = 3	16
Rangsumme	458
T	287
Näherung	
Mittelwert von T	144
Standardabweichung von T	28,98275
U	4,933969
Prob ( $\hat{z} > 3.993$ ) = p	0,000001

*Tabelle 11 Statische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 3 zum Zeitpunkt t-15*

Die MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=15' in der histologischen Schädigungsgruppe 1 wurden mit den MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=15' in der histologischen Schädigungsgruppe 3 verglichen. Es zeigte sich auch bei diesem Vergleich ein signifikanter Unterschied.

Die statistische Auswertung der Stichproben Gruppe 2 mit Gruppe 3 erfolgte unter  $H_0$ : Die Zufallsvariante hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariante ist in der Grundgesamtheit (Histo2) stochastisch größer als in Histo 3.

Es ergab sich eine Rangsumme von 586 im Vergleich der Gruppen 1 und 3 bei T=15. Daraus errechnete sich ein U von 3,59. Dieser Wert wurde verglichen unter der Maxime:

Wenn  $U > U_{\alpha, n1, n2}$  dann Annahme von  $H_0$ .

Wenn  $U \leq U_{\alpha, n1, n2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$ .

Der Vergleich ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 das  $U \leq U_{\alpha, n1, n2}$  ist und damit die Nullhypothese zurückgewiesen werden muss. (Tabelle 12)

Das Ergebnis lautet: Zum Zeitpunkt t-15 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben. Der MEGX-Test kann zu diesem Zeitpunkt in seinen Werten die histologischen Befunde bestätigen.



MEGX-Wert 15 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 2 mit MEGX-Wert 15 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 3	
Variablen:	Probengröße
T -15, Histo = 2	23
T -15, Histo = 3	16
Rangsumme	586
T	310
Näherung	
Mittelwert von T	184
Standardabweichung von T	35,0238
U	3,597554
Prob ( $\bar{z} > 3.993$ ) = p	0,0003

*Tabelle 12 Statische Auswertung: Histologischer Grad 2 zu 3 zum Zeitpunkt t-15*

Die MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=15' in der histologischen Schädigungsgruppe 2 wurden mit den MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=15' in der histologischen Schädigungsgruppe 3 verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Die statistische Auswertung der Stichproben Gruppe 1 mit Gruppe 2 erfolgte unter  $H_0$ : Die Zufallsvariante hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariante ist in der Grundgesamtheit (Histo1) stochastisch größer als in Histo 2.

Es ergab sich eine Rangsumme von 535 im Vergleich der Gruppen 1 und 2 bei  $T=30$ . Daraus errechnete sich ein U von 4,12. Dieser Wert wurde verglichen unter der Maxime:

Wenn  $U > U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Annahme von  $H_0$ .

Wenn  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$ .

Der Vergleich ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 das  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  ist und damit die Nullhypothese zurückgewiesen werden muss. (Tabelle 13)

Das Ergebnis lautet: Zum Zeitpunkt t-30 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben. Der MEGX-Test kann zu diesem Zeitpunkt in seinen Werten die histologischen Befunde bestätigen.

MEGX-Wert 30 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 1 mit MEGX-Wert 30 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 2	
Variablen:	Probengröße
T -30, Histo = 1	18
T -30, Histo = 2	23
Rangsumme	535
T	364
Näherung	
Mittelwert von T	207
Standardabweichung von T	38,06573
Z	4,124445
Prob ( $z > 3.993$ ) = p	0,0000

*Tabelle 13 Statische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 2 zum Zeitpunkt t-30*

Die MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=30' in der histologischen Schädigungsgruppe 1 wurden mit den MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=30' in der histologischen Schädigungsgruppe 2 verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Die statistische Auswertung der Stichproben Gruppe 1 mit Gruppe 3 erfolgte unter  $H_0$ : Die Zufallsvariante hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariante ist in der Grundgesamtheit (Histo1) stochastisch größer als in Histo 3.

Es ergab sich eine Rangsumme von 459 im Vergleich der Gruppen 1 und 3 bei T=30. Daraus errechnete sich ein U von 4,9. Dieser Wert wurde verglichen unter der Maxime:

Wenn  $U > U_{\alpha, n1, n2}$  dann Annahme von  $H_0$ .

Wenn  $U \leq U_{\alpha, n1, n2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$ .

Der Vergleich ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 das  $U \leq U_{\alpha, n1, n2}$  ist und damit die Nullhypothese zurückgewiesen werden muss. (Tabelle 14)

Das Ergebnis lautet: Zum Zeitpunkt t-30 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben. Der MEGX-Test kann zu diesem Zeitpunkt in seinen Werten die histologischen Befunde bestätigen.

MEGX-Wert 30 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 1 mit MEGX-Wert 30 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 3	
Variablen:	Probengröße
T -30, Histo = 1	18
T -30, Histo = 3	16
Rangsumme	459
T	288
Näherung	
Mittelwert von T	144
Standardabweichung von T	28,98275
Z	4. 968472
Prob ( $\bar{z} > 3.993$ ) = p	0,000001

Tabelle 14 Statistische Auswertung: Histologischer Grad 1 zu 3 zum Zeitpunkt t-30

Die MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=30' in der histologischen Schädigungsgruppe 1 wurden mit den MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=30' in der histologischen Schädigungsgruppe 3 verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Die statistische Auswertung der Stichproben Gruppe 2 mit Gruppe 3 erfolgte unter  $H_0$ : Die Zufallsvariante hat in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung.

Des Weiteren formulieren wir eine Alternativhypothese:

$H_1$ : Die Zufallsvariante ist in der Grundgesamtheit (Histo2) stochastisch größer als in Histo 3.

Es ergab sich eine Rangsumme von 582 im Vergleich der Gruppen 1 und 2 bei  $T=15$ . Daraus errechnete sich ein U von 3,48. Dieser Wert wurde verglichen unter der Maxime:

Wenn  $U > U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Annahme von  $H_0$ .

Wenn  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  dann Zurückweisung von  $H_0$ .

Der Vergleich ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 das  $U \leq U_{\alpha, n_1, n_2}$  ist und damit die Nullhypothese zurückgewiesen werden muss. (Tabelle 15)

Das Ergebnis lautet: Zum Zeitpunkt t-30 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben. Der MEGX-Test kann zu diesem Zeitpunkt in seinen Werten die histologischen Befunde bestätigen.

MEGX-Wert 30 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 2 mit MEGX-Wert 30 min nach Lidocaingabe bei histologischen Grad 3	
Variablen:	Probengröße
T -30, Histo = 2	23
T -30, Histo = 3	16
Rangsumme	582
T	306
Näherung	
Mittelwert von T	184
Standardabweichung von T	35,0238
Z	3,483346
Prob ( $\ddot{o} z \ddot{o} > 3.993$ ) = p	0,0005

*Tabelle 15 Statistische Auswertung: Histologischer Grad 2 zu 3 zum Zeitpunkt t=30*

Die MEGX-Testwerte zum Zeitpunkt t=30' in der histologischen Schädigungsgruppe 2 wurden mit den MEGX-Testwerten zum Zeitpunkt t=30' in der histologischen Schädigungsgruppe 3 verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Die statistisch gewonnenen Daten zeigen, dass im Vergleich der MEGX-Werte bei T - 15 wie auch bei T - 30 mit den drei Graden der histologisch nachweisbaren Leberschäden signifikante Unterschiede bestehen, die mit dem MEGX-Test nachgewiesen werden können.

Das Ergebnis der statistischen Auswertung ergibt, zwischen den histologischen Gradeinteilungen kann in diesem Versuch mittels MEGX-Test sicher unterschieden werden kann. Die Ergebnisse zeigen selbst signifikante Unterschiede zwischen dem histologischen Grad 2 und 3 sowie 1 und 2.

## 5. Diskussion

### 5.1. Beschriebene Untersuchungen an gesunden Probanden

In klinischen Studien mit gesunden Probanden zum MEGX-Test wurde der beste Zeitpunkt zur Messung von MEGX bei 15 min nach einer Bolusinjektion über 2 min. von 1 mg/kg Körpergewicht Lidocain gefunden. Es zeigten sich die höchsten Spiegel 15 min nach Injektion und gleich bleibend hohe Blutspiegel bis zu zwei Stunden. (OELLERICH et al. 1987)

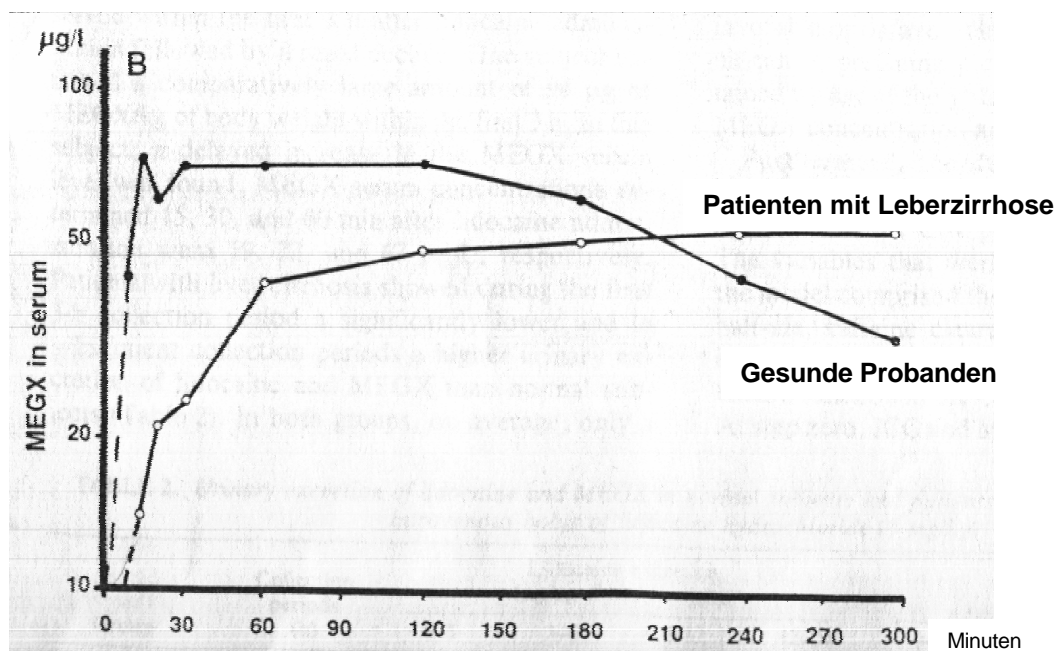


Abbildung 5 Konzentrationsverlauf von MEGX

Die optimale Dosis von Lidocain zur Durchführung des MEGX-Tests wird mit 1mg/kg Körpergewicht angegeben. Diese Menge befindet sich im subtherapeutischen Bereich der Dosen, welche zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen klinisch appliziert werden. (SCHRÖDER et al. 1989; RADEMAKER. et al. 1986)

Die Halbwertszeit von Lidocain beträgt 1,3 bis 2,3 Stunden, das Verteilungsvolumen liegt zwischen 0,9 und 1,6 l/kg beim Menschen. Die Plasmaproteinbindung wird mit 64% und der First-Pass Effekt mit 50% angegeben. Vergiftungen und Todesfälle durch Lidocain sind selten und erfordern eine Initialdosis von 250 mg bis 1000 mg Lidocain. Lidocain Plasmakonzentrationen von > 5 mg/l können toxisch wirken. Vergiftungserscheinungen zeigen sich hauptsächlich im zentralen Nervensystem in Form von Schwindel,

Somnolenz, Desorientiertheit, Atemdepression, Krampfanfälle und in schweren Fällen als Koma. Am Herzen kann Lidocain in toxischer Konzentration einen Herzblock und ventriculäre Tachyarrhythmien hervorrufen. (PEAT et al. 1985; POWELL et al. 1986)

Lidocain wird durch das Cytochromsystem der Leber metabolisiert. In neueren Untersuchungen zeigte sich auch eine geringe Stoffwechselaktivität in der Lunge. Bei gesunden Probanden zeigen sich nach intravenöser Applikation von 1 mg/kg Körpergewicht Lidocain ein MEGX-Blutspiegel von > 90 ng/l.

Dieser Wert wurde als untere Grenze bezüglich einer ausreichenden Leberfunktion postuliert. Zu Beachten ist dennoch, dass das Cytochrom P-450 IIIA4 auch andere klinisch wichtige Substanzen, wie Cyclosporin, Nifedipin, Midazolam, usw. metabolisiert. Es ist noch nicht ausreichend geklärt, welchen Einfluss diese Substanzen auf den Lidocain-Metabolismus haben können. Ferner weiß man, dass Glucocortikoide, Phenobarbital, Trioleandomycin und Rifampin das Cytochrom P-450 III A 4 in seiner Wirkung induzieren. (BARGETZI et al. 1989)

Der Nachweis des MEGX wird mittels eines Fluoreszenz-Polarisations-Immuno-Assay (FPIA) an einem TDx-Prozessor durchgeführt. Der FPIA beruht auf einer Immunoassaymethode mit kompetitiver Bindung. Reaktionsbestandteile dieser Reaktion sind das Antigen in der Patientenprobe, der Antikörper und ein mit Fluorescein beladenes Antigen. Die gemessene Fluoreszenzintensität einer Probe mit Fluorezenzfarbstoff (Fluorescein) ist zur Extinktion der Lösung proportional. Daraus lässt sich der unter Verwendung von Kalibratoren die Menge der zu analysierenden Substanz (in diesem Fall MEGX) errechnen.

Der FPIA erlaubt einen schnellen und sicheren quantitativen Nachweis von Monoethylglycinxylylidid (MEGX) im Serum sowie auch im Urin. Ein TDx-Prozessor findet sich in fast jeder Klinik, da er auch mit anderen Testkits für z. B. Vancomycin, Cyclosporin, Drogen, etc. beschickt werden kann. Für den MEGX-Test werden pro Probe nur 100 µl Serum oder Plasma benötigt, die Testdauer der drei Einzelproben beträgt 20 Minuten. Die Gesamttestdauer beträgt vom Zeitpunkt der ersten Blutentnahme bis zum Analysenende etwa eine Stunde.

Eine weitere Methode ist der Nachweis von MEGX mittels High-pressure liquid chromatography (HPLC) die eine ähnliche Nachweisgrenze für MEGX hat wie der FPIA. (CHEN, POTTER, RAVENSCROFT 1992) Der Nachweis mittels HPLC soll etwas kostengünstiger als der FPIA sein. Beide Verfahren haben sich mittlerweile in den Kliniken etabliert.

## 5.2. Beschriebene Untersuchungen an Leberzirrhotikern

Das morphologische Korrelat einer Leberzirrhose ist der knotige Umbau des Lebergewebes. Dies bedingt in den meisten Fällen eine Verminderung der portalen Leberperfusion. Die entstandenen pathologischen Veränderungen lassen sich durch diesen Mechanismus erklären.

Nach Lidocaingabe ist auffällig, dass bei Patienten mit Leberzirrhose sich eine initial verminderte MEGX-Produktion zeigt. Der MEGX-Anstieg verläuft verlangsamt innerhalb von 60 Minuten und verharrt auf einem Plateau um 50 µg/l über einen Zeitraum von 4 Stunden. (siehe Abbildung 5)

Die Gesamtmenge des bei Zirrhose von der Leber metabolisiertem MEGX ist deutlich niedriger als bei gesunden Probanden. Die Halbwertszeit ist somit verlängert. (HUANG et al. 1993; OELLERICH et al. 1990, 1991; FORTE et al. 1994)

Die Überlebenswahrscheinlichkeit ohne Transplantation, ist bei Patienten mit Leberzirrhose im Endstadium, für die nächsten 120 Tage bei niedrigen Testergebnissen (MEGX unter 90 µg/l) schlechter als bei solchen die über 90 µg/l MEGX liegen. (OELLERICH, BURDELSKI, LAUTZ 1989)

Forte et al. demonstrieren einen Unterschied des MEGX-Test bei Patienten im Stadium der kompensierten und der dekompenzierten Leberzirrhose. (FORTE et al. 1994) Die gefundenen MEGX-Werte sind bei Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose signifikant niedriger. Dieses Ergebnis ist gut kompatibel zu den oben genannten Untersuchungsergebnissen von Oellerich.

Ein Test, der signifikant eine Voraussage von 120 Tagen bezüglich einer zum Leben ausreichenden Leberfunktion ermöglicht, ist in der Lage bei ausreichendem Spenderangebot Risikotransplantationen auf ein Minimum zu reduzieren. Nach den Untersuchungen ist zu erwarten, dass der MEGX-Test dieses Kriterium erfüllen kann.

### 5.3. Beschriebene Untersuchungen an Leberspendern

Von ADAM et al. wird beschrieben, dass an 54 potentiellen Spendern der MEGX-Test durchgeführt wurde. Bei abgelehnten Spendern wurde ein MEGX-Testwert bei T-15 von  $< 50 \mu\text{g/l}$  gemessen. Dieses Ergebnis stimmt mit dem makroskopischen Erscheinungsbild der zu entnehmenden Lebern überein. Makroskopisch und histologisch erkennt man bei den abgelehnten Lebern massive Verfettungen, Koagulationsnekrosen, Zirrhosen, sowie in einem Fall ein SGPT -Spiegel über 730 U/l. Der Mittelwert von MEGX zum Zeitpunkt T-15 bei abgelehnten Spenderlebern war signifikant niedriger als bei akzeptierten. (ADAM et al. 1991; 1993) Auch bei unseren Untersuchungen zeigt sich ein solcher Zusammenhang.

Im Rahmen des Spenderscreening zeigte sich, dass die Transplantatüberlebenszeit signifikant höher und die Rate der PNF niedriger ist, wenn die Leber von Spendern mit einem MEGX-Testwert von  $>90 \mu\text{g/l}$  (bei T-15 min) kommt, als wenn sie von Spendern mit niedrigeren Werten stammt. (OELLERICH et al. 1989 , 1992, 1993 ; TESI et al. 1993)

Wenn die Entscheidung der Akzeptanz oder der Ablehnung unter zu Hilfenahme des MEGX-Test geschieht, verringert sich das Risiko einer initialen Nichtfunktion (INF) von 1 zu 3. (BURDELSKI et al. 1987)

Es stellt sich die Frage, ob der Einfluss von vasoaktiven Substanzen wie Dobutamin, oder Dopamin einen Einfluss auf die Leberdurchblutung haben können und wie sich dieses auf den MEGX-Test auswirkt. Bekannt ist eine steigernde Wirkung von Katecholaminen auf die Glycogenolyse

Der MEGX-Test ist bei der Auswahl von Spenderlebern mittlerweile fest etabliert. (BALDERSON et al. 1992)

Das makroskopische Bild einer Spenderleber korreliert nicht immer mit den gefundenen histologischen Befunden. INF wurde in beiden Kategorien gefunden. Die Unterscheidung zwischen normaler und pathologischer Spenderleberhistologie ist mit dem MEGX-Test möglich. (BURDELSKI et al.1989)

Karayalcin et al. beschreibt die Möglichkeit, den MEGX-Test in die Auswahl einer Spenderleber zu involvieren, bestreitet jedoch dessen Aussagewert. (KARAYALCIN et al. 1994)



## 5.4. Beschriebene Untersuchungen am Transplantatempfänger

Transplantatdysfunktionen bei Lebertransplantationen, insbesondere die PNF können verschiedene Ursache haben. Spenderbedingte Erkrankungen und / oder Verletzungen sowie Konservierungs- und Reperfusionsschäden sind die häufigsten Ursachen. (CLAVIEN et al. 1992)

Bei Vergleichen innerhalb des Europäischen Lebertransplantationsregister zeigte sich, dass es bei 6 % aller Lebertransplantationen zu einer primären Nicht-Funktion (PNF) kommt. (BURDELSKI et al. 1988)

In der frühen postoperativen Phase nach einer orthotopen Lebertransplantation ist es schwer zu unterscheiden, ob es sich um ein reversibles oder irreversibles primäres Nichtfunktionieren (PNF) des Transplantats handelt. Mit dem MEGX-Test lassen sich beide Formen diskriminieren. Ein hoher MEGX-Wert lässt auf ein reversibles Versagen schließen. Aus dem Verlauf bei kontinuierlich durchgeführten MEGX-Tests in der frühen posttransplantations Phase lässt sich besser der Zeitpunkt einer eventuellen ReTx planen. (LAMESCH et al. 1990) Diese wäre dann bei deutlichem MEGX-Abfall im Serum indiziert.

## 5.5. Die Validität der Prognose des MEGX-Test im Vergleich zu anderen klinischen Parameter

Spenderlebern mit einem MEGX-Testwert niedriger als 80 µg/l (bei T-15) zeigen beim Empfänger einen höheren GOT und GPT Wert und einer niedrigeren Prothrombin-Zeit am 5. Tag. Ein Unterschied in der täglichen Bilirubinproduktion wurde nicht gefunden. (ADAM et al. 1993)

Auffällig ist, dass die Serumtransaminasenspiegel bei Menschen nach einer Lebertransplantation nicht mit der Transplantatüberlebenszeit korrelieren. Konventionelle Leberfunktionsparameter wie GOT, Gesamt- Bilirubin und Gerinnung in der frühen postoperativen Phase sind unzuverlässig und zeigen nicht früh genug ein Nichtfunktionieren des Transplantats an. (SCHIFFMAN et al. 1994)

## 5.6. Der MEGX-Test im Vergleich zu anderen Leberfunktionstests

Um den MEGX-Test im Vergleich zu anderen Leberfunktionstests darzustellen folgt eine kurze Darstellung der zum Vergleich infrage kommenden Tests.

### 5.6.1. Der Indocyaningrün-Test (ICG)

Beim ICG-Test wird die Elimination von ICG durch die Leber gemessen. Dadurch, dass ICG nicht metabolisiert wird, und eine hohe hepatische Exkretion aufweist, lassen sich Aussagen über die Leberdurchblutung machen. Testdurchführung: Nach einer i.v. Injektion von 0,5 mg/kg/Körpergewicht Indocyaningrün werden zum Zeitpunkt 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten nach Injektion Serumproben gesammelt. ICG wird dann photometrisch bei 805 nm bestimmt. Der Abfall des Serum-ICG-Spiegels zeigt die Metabolisierungsrate der Leber. (CLEMENTS, ELIAS, MCMASTER 1991; HEMMING et al. 1992; OTT, KEIDING, BASS 1992)

### 5.6.2. Die Galaktoseeliminationskapazität (GEK)

Die Galaktoseeliminationskapazität ist ein laborchemischer Test. Der zu messender Parameter ist die kapazitätsabhängige Metabolisierung im Zytosol. Galaktose hat eine niedrige hepatische Extraktionsrate und wird unabhängig vom Cytochromsystem metabolisiert. Die initiale Phosphorylierung durch die zytoplasmatische Galaktokinase ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt. Wird Galaktose in einer hohen Dosis appliziert, um eine Sättigung des Enzymsystem zu erreichen, so kann seine Elimination als Ausdruck der funktionellen Leberzellmasse gesehen werden. (ZOTZ, et al. 1993; TANG, HU 1992)

Testdurchführung: Nach einer i.v. Injektion von 0,5 g/kg KÖRPERGEWICHT Galaktose werden zum Zeitpunkt 0, 20, 30, 45 und 60 Minuten Serumproben, sowie nach 60 Minuten eine Urinprobe gesammelt. Photometrisch werden die Galaktosespiegel im Serum und im Urin gemessen. Der Abfall von Galaktose in Serum und die Ausscheidung von Galaktose im Urin zeigt die Exkretionsleistung der Leber an. (LAMESCH et al. 1990)

### 5.6.3. Der <sup>14</sup>C-Aminopyrin-Atemtest

Es wird die Bildung von isotope-markiertem CO<sub>2</sub> durch Demethylierung des <sup>14</sup>C-Dimethyl-Aminopyrins gemessen. Mit diesem Test wird die Funktion des Cytochrom P-450 Systems quantitativ erfasst. Die Entgiftungskapazität der Leber wird dargestellt.

Testdurchführung: Es werden die Atemproben des nüchternen Patienten vor und 30 Minuten nach der i.v. Injektion von 50 kBq <sup>14</sup>C-markiertem Aminopyrin gewonnen und die <sup>14</sup>C-Aktivität im  $\beta$ -Counter gemessen. Der Normalbereich liegt bei 0,6 -1% Dosis x kg/mmol CO<sub>2</sub>. (ADOLF et al. 1992 ; PERRI et al. 1994)

### 5.6.4. Der Coffein-Test

Coffein (1,3,7-Trimethylxanthine) wird in der Leber durch Monooxygenasen wie Cytochrom P-450 demethyliert und anschließend oxidiert. Das Abbauprodukt ist Paraxanthin. Dieser Test zeigt die Metabolisierungsleistung und somit die funktionelle Leberzellmasse.

Testdurchführung: Der Coffein-Test erfordert eine 24 stündiges Vermeiden von Methylxanthinen. Blutproben werden zum Zeitpunkt 0 und 2, 4, 6, 8, 16 und 24 Stunden nach einer Infusion von Coffein (3 mg/kg Körpergewicht), oder alternativ nach oraler Gabe von 200-300 mg Coffein, entnommen. Die Paraxanthinkonzentration wird mittels Enzym-Immunoassay bestimmt. Paraxanthin und weitere Metaboliten können auch im Urin nachgewiesen werden. (KALOW, TANG 1991; MCDONAGH et al. 1991; BALISTRERI et al. 1992; DARNOT, NEMESANSZKY, BARISKA 1995; RENNER et al. 1984)

### 5.6.5. Der Bromsulfo-phthalein Test

Der Test dient zur Prüfung der exkretorischen Leberfunktion und zeigt so die Leberdurchblutungsleistung an.

Die Leber resorbiert eine i.v. injizierte standardisierte Menge Bromsulfo-phthalein aus dem Blut und scheidet es mit der Galle aus. Bei normaler Leberfunktion sind etwa 95% des Bromsulfo-phthaleins nach 45 Min. aus dem Blut entfernt. (PSCHYREMBEL 256. Auflage)

## 5.7. Der MEGX-Test im Vergleich

Andere Leberfunktionstest wie der GEK, der <sup>14</sup>C-Aminopyrin-Atemtest, der Coffein-Test und der Bromsulfophthaleintest sind zu zeitaufwendig, zu ungenau und zu kompliziert in der Durchführung. Sie erfordern zum Teil ein mehrstündiges Vermeiden von Medikamenten und sind sie in ihrem Aussagewert umstritten.

Der ICG und der MEGX-Test erlauben frühzeitig eine Unterscheidung zwischen Erfolg und Misserfolg einer Lebertransplantation. (LAMESCH et al. 1990) Beide Tests untersuchen das Cytochrom P-450 System und damit die Leberdurchblutung. Sind also Teile des Leberparenchyms durch Minderperfusion, oder Reduktion der Durchblutung in Mitleidenschaft gezogen worden, so reflektiert sich dieses in diesen beiden Tests. (SHIMANUKI et al. 1993) Der MEGX-Test wird zu Zeit nur als zusätzliches Kriterium zu Verifizierung von Transplantatminderfunktion genutzt. Zentren wie Hannover oder Göttingen nutzten ihn als Standardtest zur Evaluierung und postoperativen Nachsorge. (BURDELSKI et al. 1988 OELLERICH et al.1990)

Schröder und seine Arbeitsgruppe beschreiben niedrige MEGX-Testwerte bei Abstoßung und ischämischen Schäden. (SCHRÖDER et al.1989)

Neben dem ICG-Test existiert ein weiterer signifikanter Zusammenhang zwischen MEGX-Werten und Antithrombin III Werten sowie zwischen dem postoperativen Maximum der Aspartat-Aminotransferase. Keine weitere Beziehung besteht in anderen konventionellen Leberfunktionstests und dem MEGX-Test. (SHIMANUKI et al. 1993)

Die Leberfunktionsmessung mittels Paracetamolhalbwertszeit im Vergleich zum MEGX-Test zeigt die Überlegenheit des MEGX-Test vor allem in der geringeren Hepatotoxizität und der Genauigkeit. (FORREST et al. 1977)

## 5.8. Der MEGX-Test im Tiermodell - Vergleiche zum Menschen

Ein hepatotoxischer Effekt von Lidocain wurde bei Untersuchungen an isoliert perfundierten Rattenlebern nicht beobachtet. (LENNARD, TUCKER and WOODS 1983)

Es ist zu bemerken, dass operative Maßnahmen und Lebertumoren keinen Effekt in der Zusammensetzung von Cytochrom P 450 Enzymen bei humanen Lebermikrosomen hervorrufen.

Die Umsetzungsgeschwindigkeit von Lidocain zu MEGX in menschlichen Lebermikrosomen zeigt eine Aktivität von  $2.68 \pm 1.83$  nmol/min/mg. Dieser Wert ist der bei Ratten gemessenen Aktivität von  $4.10 \pm 0.78$  nmol/min/mg aufgrund der höheren Varianz als gleich anzusehen. (IMAOKA et al. 1990)

Humane Lebermikrosomen produzieren vorwiegend MEGX aus Lidocain, 3-OH-Lidocain wird nur mit schwacher Aktivität gebildet. Menschliche Lebermikrosomen und Rattenlebermikrosomen produzieren kein Me-OH-Lidocain. Monoethylglycinexylidide ist kein direkter Inhibitor des Lidocain Metabolismus. (ODA et al. 1989)

Die normale Halbwertszeit von Lidocain nach einer einmaligen intravenösen Gabe bei Ratten beträgt etwa 30 min. Beim Menschen beträgt sie bei gleicher Applikationsart etwa 90 min. (DRUCKENBROD et al. 1991)

Am Modell der perfundierten Rattenleber zeigt sich bei kontinuierlicher Infusion von Lidocain ein maximaler MEGX-Wert schon nach 5 min. Dies lässt sich durch die höhere Konzentration von Lidocain erklären. (TAM et al. 1987, 1994)

Die optimale Wirkstoffdosis bei Ratten von Lidocain für den Nachweis von MEGX im Blut wurde in Wirkstudien an gesunden nicht traumatisierten Ratten ermittelt und beträgt 2 mg/kg Körpergewicht. Bei Ratten mit Leberteileresektionen zeigte sich eine Verminderung der Produktion von MEGX im Verhältnis zu der Kontrollgruppe. (DRUCKENBROD et al. 1991) Das ist unterschiedlich zu den Ergebnissen am Menschen. Dort wurde kein Einfluss einer Leberteileresektion auf den MEGX-Test beschrieben. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe der University of Cincinnati lassen vermuten, dass der MEGX-Test ein qualitativer aber kein quantitativer Test zur Messung der Leberfunktion ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen Leberzellmasse und MEGX-Testwert lässt sich nicht darstellen. (DRUCKENBROD et al. 1991)

Bei Versuchen an isoliert perfundierten Rattenlebern wurde von Lennard festgestellt, dass ein Unterschied im Metabolismus von Lidocain zwischen männlichen und weiblichen Ratten existiert. Männliche Tiere eliminieren Lidocain schneller als weibliche Tiere. (LENNARD et al. 1983)

Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Metabolisation von Lidocain zwischen Männern und Frauen gibt, jedoch zeigt sich bei Frauen die Kontrazeptiva nehmen, eine deutlich verminderte T-30 MEGX-Konzentration. (OELLERICH et al. 1994)

Bei Versuchen an mit humanem Blut isoliert perfundierten Schweinelebern zeigt sich der MEGX-Test als guter Indikator zur Messung des Integritätsverlust durch xenogenischen

Reaktionen. Die MEGX-Werte korrelieren mit den gefundenen histologischen Schäden. (LIM et al. 1992)

1994 wurde der Nachweis erbracht, dass auch extrahepatische Microsomen Lidocain zu MEGX metabolisieren können, K. Tanaka und seine Arbeitsgruppe fanden heraus, dass insbesondere die Lungenmikrosomen der Ratte eine hohe Metabolisierungsleistung haben. (TANAKA et al. 1994)

Bei Ratten ist aufgrund eines veränderten Metabolismus die Halbwertszeit von Lidocain kürzer als beim Menschen. (30 bis 90 min) Biochemische Studien bei Ratten bestätigen jedoch die Vergleichbarkeit des humanen Cytochrom P-450NF (P-450III<sub>A4</sub>) mit dem Ratten Cytochrom P-450NF. Cytochrom P-450NF (P-450III<sub>A4</sub>) ist das Hauptenzym bei der N-deethylation in menschlichen Lebermikrosomen. (IMAOKA et al. 1990; BARGETZI et al. 1989) Unterschiede in der Metabolisierung von Lidocain wurden bei Dark Agouti Ratten im Vergleich zu Wistar Ratten beschrieben. Bei Dark Agouti Ratten bestehen Unterschiede in der Metabolisierung zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Bei unseren Versuchen benutzen wir ausschließlich männliche Lewis Ratten und können somit oben genannte Interferenzen vernachlässigen.

Die Eliminationshalbwertszeit von Lidocain zeigt tierspezifische Unterschiede, so beträgt die HWZ beim Schwein etwa 33 min., beim Schaf 42 min. und beim Affen 15 min.

## 5.9. Eigene Ergebnisse - Auswirkungen auf die klinische Medizin

In unseren Experimenten beobachteten wir steigende MEGX-Werte von 15 bis 30 min, ähnlich wie bei Patienten mit Leberzirrhose.

Das Hauptergebnis unserer Studie ist die Tatsache, dass der MEGX-Test signifikant mit den histologisch erkennbaren Schäden in transplantierten Lebern korreliert. Verschiedene, durch bewusst lange Konservierungszeiten geschädigte Lebern zeigen eine deutliche Reduktion der Metabolisierungsleistung und damit der Produktion von MEGX.

Es ist deutlich zu sehen, dass selbst geringe Unterschiede im pathologischen Grading durch den MEGX-Test zuverlässig mit einer Signifikanz von  $p = 0,0001$  erkannt werden. Unsere Empfängertiere bekamen vor und nach der Transplantation außer einer Schmerzmedikation keine weiteren Medikamente.

Diese Erzeugung von Schäden durch eine Verlängerung der kalten Ischämiezeit in den transplantierten Lebern spiegelt die reale Situation einer Lebertransplantation wider.

Konservierungsschäden und lange kalte Ischämiezeiten sind auch die Probleme bei der humanen LTx. Jedoch spielt beim menschlichen Spender noch die zu seinem Hirntode führende Ursache und die intensivmedizinischen Maßnahmen eine Rolle.

Die Arbeitsgruppe um Druckenbrod verneint eine Korrelation zwischen dem Ausmaß einer Leberteilresektion und der Bildung von MEGX. (DRUCKENBROD et al. 1991) Dieses kann dadurch erklärt werden, dass die Leber eine funktionelle Reservekapazität hat und die Hepatozyten der verbliebenen Restleber nicht in ihrer Gesamtheit einer Noxe ausgesetzt waren, wie bei einer kalten und warmen Ischämie

Unsere Ergebnisse stimmen mit anderen Veröffentlichungen überein, dass der MEGX-Test ein globaler Indikator für die Integrität von ex- und transplantierten Lebern ist. Der MEGX-Test kann in den Prozess des Spenderscreening wie auch als Posttransplantationstest eingesetzt werden. Er ist valide genug, um zur Transplantatüberwachung in der ersten postoperativen Phase eingesetzt werden zu können. Zustände wie eine initiale primäre Nichtfunktion, Konservierung und Reperfusionsschäden können gut dargestellt werden.

Reding und seine Arbeitsgruppe behaupten 1993, dass der MEGX-Test unzuverlässig bezüglich der Leberfunktion sei, da als Einflussgröße die Leberdurchblutung nicht berücksichtigt wird.

Veränderungen in der Leberdurchblutung können sich auf die Lidocainclearance als nicht zu unterschätzender Faktor auswirken. Ferner seien Untersuchungen des MEGX-Test an Laborratten nicht vergleichbar mit den Untersuchungen am humanen Modell, da sie nicht den gleichen Einflüssen ausgesetzt sind. (REDING et al. 1993)

Diesem kann insoweit zugestimmt werden, dass die Einflüsse am humanen Realfall zu der Untersuchung an der Laborratte divergieren, aber die histologisch nachweisbaren Schäden und deren Einfluss auf die Metabolisierungsleistung der Leber bleibt unumstritten. Inwieweit wechselnde Veränderungen in der Leberdurchblutung innerhalb der 30 minütigen Testdurchführung eine Rolle bei der Beurteilbarkeit des MEGX-Test spielen, ist im Rahmen unserer Untersuchung nicht zu beantworten.

Nach unseren Untersuchungen eignet sich der MEGX-Test als hilfreiche Ergänzung zur Erkennung von hepatozytären Schädigungen in der frühen postoperativen Phase sowie in der Transplantationsnachsorge.

Ferner ist der MEGX-Test ein kostenarmer und schneller Test der in der Lage ist, bei zur Transplantation anstehenden Patienten mit zirrhotisch veränderte Lebern im Zustand der labilen Kompensation eine Kurzzeitprognose der folgenden 120 Tage zu erstellen.

Wir können aufgrund unserer Untersuchungen konstatieren, dass ein MEGX-Wert von 90 ng/l histologisch bewiesene Leberzellschäden nach unserer Einteilung zwischen Grad 1 und Grad 2 beschreibt.

Zum Zeitpunkt der Versuche werden noch routinemäßig Transplantatbiopsien durchgeführt. Ob auf Biopsien bei stabilen MEGX-Werten von > 110 µg/l im Verlauf aufgrund der wachsenden Erfahrungen mit dem MEGX-Test reduziert werden können, bleibt abzuwarten.

In letzter Zeit wird auch die per orale Gabe von Lidocain zum Zwecke des MEGX-Test beschrieben. Man macht sich hierbei den first past Effekt des Medikaments zu nutzen. Eine systemische Belastung findet so nur vermindert statt. ( KLINKER et al. 1993)

### 5.9.1 Nachwort

16 Jahre nach dieser Studie, zeigt sich dass keiner der vorgestellten Testverfahren einschließlich des MEGX-Tests langfristig Einzug in die Routine bei Lebertransplantationen, -Tumor Chirurgie oder Organspenden erfahren hat. Immer mehr etablieren sich Methoden wie die 3D-Computertomographie der Leber in Kombination mit Kontrastmittel (z.B. Ultravist) in Kombination mit Softwareprogrammen wie AMIRA die das Lebervolumen errechnen. (HARMS et al. 2005, BRAUM Dissertation Charité 2010) Genau so haben Kernspintomographische Untersuchungen der Leber ihren Anteil gefunden. (SAITO et al. 2008) Aktuell wird ein neues Testverfahren, der LiMAX-Test welcher mit der CT Diagnostik kombiniert wird vorgestellt. Lebertransplantationszentren in Bochum, Hannover, Frankfurt, und Heidelberg berichten, dass der MEGX-Test immer noch in den Laboranforderungen zu finden sei und vereinzelt z.B. zur Fragestellung der Metabolisierungsleistung eingesetzt wird.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Adam R., D. Azoulay, I. Astarcioglu et al.  
Reliability of the MEGX Test in the Selection of Liver Grafts  
Transplantation Proc. 1991;23:2470-2471
2. Adam R., D. Azoulay, I. Astarcioglu et al.  
Limits of the MEGX Test in the Selection of Liver Grafts  
Transplant. Proc. 1993;25:1653-54
3. Adolf J., W.G. Martin, D.F. Müller et al.  
Einfluss der akuten zellulären Abstoßung auf die Leberfunktion nach  
orthotoper Lebertransplantation: Quantitative  
Funktionsuntersuchungen mit dem <sup>14</sup>C-Aminopyrin-Atemtest  
Dtsch. med. Wschr. 1992;117:1823-1828
4. Albers I., H. Hartmann, J. Bircher et al.  
Superiority of the Child-Pugh Classification to Quantitative Liver  
Funktion Tests for Assessing Prognosis of Liver Cirrhosis  
Scand. J. Gastroenterol. 1989;24:269-276
5. Bachmann S., J.C. Caldwell-Kenkel, I. Oleksy, et al.  
Warm Carolina rinse solution prevents graft failure from storage  
injury after orthotopic rat liver transplantation with arterilisation  
Transplant Int 1992;5:108-114
6. Balistreri W.F., H.H. A-Kader, K.D. Setchell et al.  
New methods for assessing liver funktion in infants and children  
Ann-Clin-Lab-Sci 1992;22:162-74
7. Balderson G.A., J.M. Potter, P.E. Hickman et al.  
MEGX As a Test of Donor Liver Funktion  
Transplant. Proc. 1992;24:1960-61
8. Bargetzi M.J., T. Aoyama, F.J. Gonzalez et al.  
Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome  
P 450 III A4  
Clin Pharmacol Ther 1989;46:521-527
9. Boudjema K., B. Ellero, Y. Barguil et al.  
Addition of Reduced Glutathione to UW Solution: Clinical Impact in  
Liver Transplantation  
Transplant. Proc 1991;23:2341-2343
10. Burdelski M., M. Oellerich, P. Lamesch et al.  
Evaluation of Quantitive Liver funktion Tests in Liver Donnors  
Transplantation Proceedings 1987;29:3838-3839
11. Burdelski M. , M. Oellerich, E. Raude et al.  
A Novel Approach to Assessment of Liver Funktion in Donors  
Transplantation Proceedings 1988;20:591-593

12. Burdelski M., M. Oellerich, A. Bornscheuer et al.  
Donor Rating in Human Liver Transplantation: Correlation of Oxygen Consumption after Revascularization with MEGX Formation in Donors  
Transplantation Proceedings 1989 Vol 21:2392-2393
13. Brettschneider-L; Bell-PR; Martin-AJ et al.  
Conservation of the liver  
Transplant-Proc. 1969;1(1):132-7
14. Leonie Sarah Braum  
Leberlappen-Lebenspende: Evaluation der Leberregeneration mittels CT und MRT  
Dissertation: Charité Berlin 16.05.2010
15. Chan C., C.M. Smith  
A Fluorescence Polarisation Immunoassay for the Quantitation of Monoethylglycinexylidide (MEGX) in plasma  
Clinical Chemistry 1984;30:1018
16. Chen Y. and Potter Julia M.  
Fluorescence Polarisation Immunoassay and HPLC Assays Compared for Measuring Monoethylglycinexylidide in Liver-Transplant Patients  
Clinical Chemistry 1992;38:2426-2430
17. Chen Y, J.M. Potter and P.J. Ravenscroft  
High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of monoethylglycinexylidide and lignocaine  
Journal of Chromatography 1992;574:361-364
18. Chen Y, J.M. Potter and P.J. Ravenscroft  
A Quick, Sensitive High-Performance Liquid Chromatography Assay for Monoethylglycinexylidide and Lignocaine in Serum/Plasma Using Solid-Phase Extraction.  
Therapeutic Drug Monitoring 1992;14:317-321
19. Clavien P-A., P.R.C. Harvey, S.M. Strasberg  
Preservation and Reperfusion Injuries in Liver Allografts  
Transplantation 1992;53:957-978
20. Clements D., E. Elias, P. McMaster  
Preliminary study if indocyanine green clearance in primery biliary cirrhosis  
Scand-J-Gastroenterol. 1991;26:119-123
21. Clauß G. und H. Ebner  
Grundlagen der Statistik für Psychologen, Pädagogen und Soziologen  
Verlag Harri Deutsch Frankfurt am Main und Zürich 1972
22. Cohen et al.  
ET-Anual 1999

23. Dandliker W.B., R.J. Kelly, J. Dandliker, J. Farquhar, J. Levin  
Fluorescence Polarisation Immunoassay Theory and Experimental Method  
Immunochemistry 1973;10:219-227
24. Darnot G., E. Nemesanszky, J. Bariska  
Diagnostic value of the study of caffeine elimination in chronic liver diseases  
Orv-Hetil. 1995;136:927-932
25. Drayer D.E., B. Lorenzo, S. Werns et al.  
Plasma levels, protein binding, and elimination data of lidocaine and aktive metabolites in cardiac patients of various age  
Clin. Pharmacol. Ther. 1983;34:14-22
26. Druckenbrod R.W., C.L. Mendenhall, S.A. Myre, et al.  
Effects of Controlled Liver Injury and Ethanol Pretreatment on Monoethylglycine Xylidide Formation in the Rat  
Pharmacology 1991;42:169-176
27. Engemann, R.  
Die orthotope Lebertransplantation: funktionelle, morphologische und immunologische Untersuchung zur Tolleranz allogener Rattenlebertransplantate  
Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 1989
28. Figueras J., L.Casais, P.Moreno et al.  
Survival after liver transplantation in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma: a comparative study.  
Hepatology 1997;25(6):1485-9
29. Forrest J.A.H., N.D.C. Finlayson, K.K. Adjepon-Yamoah et al.  
Antipyrine, paracetamol, and lignocaine elimination in chronic liver disease  
British Medical Journal 1977;1:1384-1387
30. Forte G., P. Rocco, A. Constanzo et al.  
Monoethylglycinexylidide produktion as a measure in predicting hepatic histologie  
Ital. J. Gastroenterol. 1994;26:159-162
31. Gubernatis G., R. Pichelmayr, P. Lamesch et al.  
HTK-solution (Bretschneider) for human liver transplantation. First clinical experiences.  
Langenbecks-Arch-Chir. 1990;375(2):66-70
32. Hemming A.W., C.H. Scudamore, C.R. Shackleton et al.  
Indocyanine green clearance as a predictor of successful hepatic resection in cirrhotic patients  
Am-J-Surg. 1992;163:515-518

33. Huang Y-S., S-D. Lee, J-F. Deng et al.  
Measuring lidocaine metabolite - monoethylglycinexylidide as a quantitative index of hepatic function in adults with chronic hepatitis and cirrhosis  
Journal of Hepatology 1993;19:140-147
34. Imaoka S., K. Enomoto, Y. Oda et al.  
Lidocaine Metabilism by Human Cytochrome P-450s Purified from Hepatic Mikrosomes: Comparison of Those with Rat Hepatic Cytochrome P-450s  
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1990;255:1385-91
35. Jolly M. E., S.D.Stroupe, K.S. Schwenzer et al.  
Fluorescence Polarisation Immunoassay. III. An Automated System for Therapeutic Drug Determination  
Clinical Chemistry 1981;27:1575-1579
36. Harms J, M Bartels, H. Bourquain et al.  
Computerized CT-Based 3D Visualisization Technique in Living Related Liver Transplantation  
Transplantation proceedings 2005; 37:1059-1062
37. Kalow W., B. Tang  
Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking  
Clin Pharmacol Ther 1991;49:44-48
38. Kamada N., R.Y. Calne  
Orthotopic liver transplantation in the rat - Technique using cuff for portal vain anastomosis and biliary drainage  
Transplantation 1979;28:47-50
39. Kamada N., R.Y. Calne  
A surgical esperience with five hundred thirty liver transplants in the rat  
Surgery 1983; 93:64-69
40. Kamada N., R. Sumimoto, K. Kaneda  
The value of hepatic artery rekonstruction as a technique in Rat Liver Transplantation  
Surgery 1992;111:195-200
41. Karayalcin K., D.F. Mirza, R.F. Harrison et al.  
The Role of Dynamic and Morphological Studies in the Assessment of Potential Liver Donoers  
Transplantation 1994;57:1323-1327
42. Klinker H., R. Joeres, M. Bomhard et al.  
Lidocainelimination und MEGX-Bildung nach oraler Liocainbelastung - Ein praktikabler Test zur Abschätzung der quantitativen Leberfunktion  
Z. Gastroenteol.(Suppl. 2) 1993;31:52-55

43. Knoop M., S. Bachmann, H. Keck et al.  
Importance of Rearterialisation on Orthotopic Rat Liver Transplantation with Special References to Cuff Rearterialisation.  
Zeitschrift für Transplantationsmedizin 1993;5:218-221
44. Lamesch P., B. Ringe, M. Oellerich et al.  
Assessment of Liver Funktion in the Early Postoperative Period After Liver Transplantation with ICG, MEGX, and GAL Tests  
Transplantation Proceedings 1990;22:1539-1541
45. Landon E.J., R.J. Neukam and B.V.R. Sastr.  
Effects of Calcium channel blocking agents on calcium and centriobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents  
Biochemical Pharmacology 1986;35:697-705
46. Lee S., A.C. Charters, J.G. Chandler et al.  
A Technique for Orthotopic Liver Transplantation in the Rat  
Transplantation 1973;16:664-69
47. Lee S., A.C.Charters, J.G. Chandler et al.  
Prolonged Survival after Orthotopic Liver Transplantation in Inbred Rats  
Surgical Forum 1975;24:381-83
48. Lee S., A.C.Charters, M.J. Orloff  
Simplified Technic for Orthotopic Liver Transplantation in the Rat  
Am. J. Surg 1975;130:38-40
49. Lennard M.S., G.T. Tucker, H.F. Woods  
Time-Dependent Kinetics of Lidocaine in the Isolated Perfused Rat Liver  
Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 1983;11:165-181
50. Lie T.S., H.H. Hansen, K.J.Niehaus  
Bedeutung der Arterialisation des Transplantats bei Rattenlebertransplantation  
Langenbecks Arch Chir 1983;359:133-142
51. Lim S.M.L., K. Hemg, L.H. Poh et al.  
The MEGX Test as a Measure of Liver Viability in an Isolated Liver Perfusion Circuit  
Transplant. Proc. 1992;24:2293-94
52. Littlefield M., L. Kolaczowski, P.Wang et al.  
Monoethylglycinexylidide (MEGX) determined by Fluorescence Polarisation Immunoassay (FPIA) as a Liver Funktion Test  
Clin. Chem. 1988;34: 1159 Nr. 031
53. Llovet JM; Rodes J; Visa J. et al.  
Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power.  
Hepatology 1998 ;27:1572-7

54. Makowka L., R.D. Gordon, S. Todo et al.  
Analysis of Donor Criteria for the Prediction of Outcome in Clinical Liver Transplantation  
Transplantation Proceedings 1987;19:2378-2382
55. Masubuchi Y., S. Umeda, M. Chiba et al.  
Selective 3-hydroxylation deficiency of lidocaine and its metabolite in Dark Agouti rats  
Biochem. Pharm. 1991;42: 693-95
56. Masubuchi Y., J. Araki, S. Narimatsu et al.  
Metabolic activation of lidocaine and covalent binding to rat liver microsomal protein  
Biochem-Pharmacol. 1992;23:2551-2557
57. McDonagh J.E., V.V. Nathan, I.C. Bonavia et al.  
Caffeine clearance by enzyme multiplied immunoassay technique: a simple inexpensive, and useful indicator of liver funktion  
Gut. 1991;32:681-684
58. Millis JM., EM. Alonso, JB. Piper et al.  
Liver transplantation at the University of Chicago  
Clin-Transpl. 1995; 187-197
59. Momii S., A. Koga  
Time-Related Morphological Changes in Cold-Stored Rat Livers  
Transplantation 1990;50:745-750
60. Neumayer und K. Wagner  
Calciumantagonisten und Gewebeprotektion  
Intensivmed 1987;24:149-162
61. Oda Y. , S. Imaoka, Y. Nakahira et al.  
Metabolism of lidocaine by purified rat liver microsomal cytochrome P-450 isoenzymes  
Biochemical Phamacology 1989;38:4439-4444
62. Oellerich M., M.E. Raude, M. Burdelski et al.  
Monoethylglycinexylidide formation kinetics: A novel approach to assesment of liver funktion  
J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:845-853
63. Oellerich M., B. Ringe, G. Gubernatis et al.  
Lignocaine metabolite formation as a measure of pretransplant liver funktion  
The Lancet 1989;1:640-642
64. Oellerich M., M. Burdelski, H.U. Lutz  
Prognostic sensitivity and specificity of the monoethylglycine-xylidide liver funktion test in transplant candidates  
J. Cin. Chem. Clin. Biochem 1989;27:757

65. Oellerich M., M. Burdelski, H.U. Lautz et al.  
Lidocaine Metabolite Formation as a Measure of Liver Funktion in Patients with Cirrhosis  
Therapeutic Drug Monitoring 1990 Vol 12:219-226
66. Oellerich M., M. Burdelski, H-U. Lautz et al.  
Assessment of pretransplant prognosis in Patients with cirrhosis  
Transplantation 1991;51:801-806
67. Oellerich M., N. Burdelski, B. Ringe et al.  
Funktionale state of the donor liver and early outcome of transplantation  
Transplant-Proc. 1991;23:1575-1578
68. Oellerich M., N. Burdelski, H-U, Lautz et al.  
Predictors of ONE-year Pretransplant Survival in Patients with Cirrhosis  
Hepatology 1991;14:1029-34
69. Oellerich M., M. Burdelski, H.U. Lautz  
MEGX: From bench to Bedside  
Am. J. of Gastroenterology 1992;87:919-21
70. Oellerich M., H. Hartmann, B. Ringe et al.  
Assesment of Prognosis in Transplant Candidates by Use of the Pugh-MEGX Score  
Transpl. Proceedings 1993;25:1116-19
71. Oellerich M., E. Schütz, F. Polzien et al.  
Influence of Gender on the Monoethylglycinexylidide Test in Normal Subjekts and Liver Donors  
Therapeutic Drug Monitoring 1994;16:225-231
72. Ott P., S. Keiding, L.Bass  
Intrinsic hepatic clearence of indocyanin green in the pig: dependence on plasma protein concentration  
Eur-J-Clin-Invest 1992;22:347-357
73. Pang K.S., J.A. Terrell, S.D. Nelson et al.  
An Enzyme-Distributed System for Lidocaine Metabolism in the Perfused Rat Liver Preparation  
J. of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 1986;14:107-130
74. Peat M.A., M. E. Deyman, D. J. Crouchet al.  
Concentrations of Lidocaine and Monoethylglycylxylidide (MEGX) in lidocaine associated deaths  
Journal of Forensic Sciences 1985;30:1048-1057
75. Perri F., M. Pastore, V. Annese et al.  
The aminopyrine breath test  
Ital-J-Gastroenterol. 1994;26:306-317
76. Potter J.M., P.E. Hickman, G. Balderson et al.  
Lignocaine Metabolism and MEGX Production in the Liver Transplant Donor Transplant. Proc. 1992;24:198-99

77. Potter J.M., G. A. Balderson, P.E. Hickman et al.  
The Value of the Donor MEGX Test in Predicting Liver Allograft Recipient Outcome  
Transplantation 1994;58:524-526
78. Powell J.R., J. Forster, J.H. Patterson et al.  
Effect of duration of lidocaine infusion and route of cimetidine administration on lidocaine pharmacokinetics  
Clin Pharm. 1986;5:993-998
79. Pschyrembel W., C. Zink, O. Dornblüth  
Klinisches Wörterbuch  
256. Auflage 1990
80. Rademaker A.W., J. Kellen, Y.K. Tam et al.  
Character of adverse effects of prophylactic lidocaine in the coronary care unit  
Clin Pharmacol Ther. 1986;40:71-80
81. Rao P.N., T.R. Walsh, L. Makowa et al.  
Purine Nucleoside Phosphorylase: A new Marker for Free Oxygen Radical Injury to the Endothelial Cell  
Hepatology 1990;11:193-198
82. Rao P.N., T.R. Walsh, L. Makowa et al.  
Inhibition of free radical generation and improved survival by protection of the hepatic microvascular endothelium by targeted erythrocytes in orthotopic rat liver transplantation  
Transplantation 1990;49:1055-1059
83. Reding R., P. Wallemacq, J. de Ville de Goyet et al.  
The unreliability of the Lidocaine/Monoethylglycinexylidide Test for Assessment of Liver Donors  
Transplantation 1993;56:323-326
84. Renner E., H. Wietholtz, P. Huguenin et al.  
Caffeine: A Model Compound for Measuring Liver Funktion  
Hepatology 1984;4:38-46
85. Ritchie J.M., N.M. Greene  
Local Anesthetics  
Seite 320 in Goodman & Gilman's  
The Pharmacological Basis of Therapeutics 8. Auflage  
Maxwell Macmillan International Editors 1991
86. Saito T, Abe T, Tsuchiya T, et al.  
Sequential magnetic resonance imaging for evaluation of Kupffer cell function  
Hepato-gastroenterology 2008;55:596-599
87. Schroeder T.J., D.A. Gremse, M.E. Mansour et al.  
Lidocaine Metabolism as an index of Liver function in hepatic transplant donors and recipients  
Transplantation Proceedings 1989;21:2299-2301



88. Shimanuki K., I. Sakurabayashi, M. Miyta et al.  
Lidocaine metabolite formation as a measure of perioperative liver funktion  
Surg-Today 1993;23:315-319
89. Smit H., Molzahn M.  
Jahresberichte der Deutschen Stiftung Organtransplantation  
Neu Isenburg 1999-2006
90. Starzl T.E., A.J. Demetris  
Livertransplantation: a 31 year perspektive  
Curr Probl. Surg. 1990;17:129
91. Steffen R., D.M. Ferguson, R.A.F. Krom  
A new Method for Orthotopic Rat Liver Transplantation with Arterial Cuff Anastomosis to the Recipient common Hepatic Artery  
Transplantation 1989;48:166-167
92. Stremmel W., R. Wojdat, M. Groteguth et al.  
Leberfunktionstests im klinischen Vergleich  
Z. Gastroenterol. 1992;30:784-790
93. Takai Y. I. Marzi, FC. Kauffman et al.  
Increase in Survival Time of Liver Transplants by Protease Inhibitors and a Calcium Channel Blocker Nisoldipine  
Transplantation 1990;50:14-20
94. Tam Y.K., M. Yau, R. Bertins et al.  
Mechanisms of lidocain kinetics in the isolated perfused rat liver. I. Effects of continuous infusion.  
Drug.Metab. Dispos 1987;15:12-16
95. Tam Y.K., J. Ke, R.T. Coutts et al.  
Quantification of three Lidocaine Metabolites and their conjugates  
Pharmaceutical Research 1990;7:504-507
96. Tanaka K., Y. Oda. A. Asada et al.  
Metabolism of Lidocaine by Rat Pulmonary Cytochrome P450  
Biochemical Pharmacology 1994;47:1061-1066
97. Tang H.S., O.Y. Hu  
Assessment of liver funktion using a novel galactose singel point method  
Digestion 1992;52:222-231
98. Tesi R.J., E.A. Elkhammas, E.A. Davies et al.  
Safe Use of Liver Donors With MEGX Values Less Than 90 ng/mL  
Transplant. Proc. 1993;25:1655-56
99. Thurman R.G., E. Apel, M. Badr et al.  
Protection of Liver by Calcium Entry Blockers  
Annals New York Academy of Sciences 1989:757-770

100. Umeshita K., M. Monden, T. Ukei et al.  
Different Cytoprotective Effects of Calcium Blockers in Hypothermic Liver Preservation  
Transplant. Proc. 1991;21:1290-1291
101. Walsh T.R., P.N. Rao, L. Makowa et al.  
Lipid Peroxidation Is a Nonparenchymal Cell Event with Reperfusion after Prolonged Liver Ischemia  
Journal of Surgical Research 1990;49:18-22
102. Yutaka O., I. Susumu, Y. Nakahira et al.  
Metabolism of Lidocaine by purified rat liver microsomal cytochrome P 450 isoenzymes  
Biochemical Pharmacology 1989;38:4439-44
103. Zotz R.B., E. Fritschka R. Lange et al.  
Erhöhte Plasma-Endothelin-Konzentration bei Patienten nach Lebertransplantation und bei Leberzirrhose  
Med. Klin. 1993;88:139-142