

**Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Ziemer**

**Untersuchungen am Grosstiermodell zum Vergleich zweier
Konservierungslösungen, Celsior® und Perfadex®, für den Einsatz in der
Lungentransplantationschirurgie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Alexander Kalinka
aus
Stuttgart**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1.Berichterstatter: Professor Dr. G. Ziemer

2.Berichterstatter: Professor Dr. Ch. Erley

Inhaltsverzeichnis

| | | Seite |
|-----------|----------------------------------------------------------------|--------------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Einführung | 1 |
| 1.2. | Geschichte der Lungentransplantation | 4 |
| 1.3. | Entwicklung der Konservierungstechniken | 6 |
| 1.4. | Entwicklung der Konservierungslösungen | 9 |
| 1.5. | Komposition von Celsior [®] und Perfadex [®] | 15 |
| 1.6. | Der Ischämie/Reperfusionsschaden | 21 |
| 1.7. | Radikalfänger | 26 |
| 1.8. | Fragestellung | 28 |
| | | |
| 2. | Material und Methoden | 29 |
| 2.1. | Material | 29 |
| 2.1.1. | Tiere | 29 |
| 2.1.2. | Perfusionslösung | 29 |
| 2.1.3. | Dilutionslösung | 30 |
| 2.1.4. | Konservierungslösungen | 30 |
| 2.2. | Versuchsprotokoll | 31 |
| 2.2.1. | Versuchsgruppen | 31 |
| 2.2.2. | Anästhesie | 32 |
| 2.2.3. | Präparation und Konservierung | 32 |
| 2.2.4. | Extrakorporaler Kreislauf | 35 |
| 2.2.5. | Beatmung | 37 |
| 2.2.6. | Reperfusion und Datenerhebung | 37 |
| 2.2.7. | Nass- und Trockengewicht | 38 |
| 2.2.8. | Malondialdehyd | 39 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.9. | Histologie | 39 |
| 2.2.10. | Statistik | 41 |
| 3. | Ergebnisse | 42 |
| 3.1. | Pulmonaler Inspirationsdruck (PIP) | 42 |
| 3.2. | Mittlerer pulmonalarterieller Druck (PAP) | 43 |
| 3.3. | Arterielle Sauerstoffsättigung (saO ₂) | 44 |
| 3.4. | Arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO ₂) | 45 |
| 3.5. | Malondialdehyd | 46 |
| 3.6. | Morphometrie | 47 |
| 3.6.1. | Parenchymanteil | 47 |
| 3.6.2. | Anteil des Luftraums | 48 |
| 3.7 | Nass/Trockengewichtsquotienten | 50 |
| 4. | Diskussion | 51 |
| 4.1. | Diskussion des Modells | 51 |
| 4.2. | Diskussion der Ergebnisse | 56 |
| 5. | Zusammenfassung | 63 |
| 6. | Abbildungen und Schemata | 66 |
| 7. | Tabellen | 67 |

8. Literaturverzeichnis 69

9. Abkürzungen 81

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die Lungentransplantation stellt heute ein etabliertes Therapieverfahren bei terminalen Lungenerkrankungen dar. Die erste Transplantation bei einem Menschen wurde bereits 1963 von HARDY durchgeführt (37). Es dauerte jedoch einige Jahre, bis die Probleme dieser Technik soweit gelöst worden waren, dass eine breitere klinische Anwendung erfolgen konnte. Heute werden weltweit über 1000 Organe pro Jahr verpflanzt (43).

Ein großes Problem stellte die adäquate Konservierung des zu verpflanzenden Organs dar. In der Zeit von der Explantation bis zur Wiederherstellung der Blutversorgung im Empfänger ist die Lunge von der Zufuhr jeglicher Nährstoffe sowie vom Abtransport der anfallenden toxischen Stoffwechselprodukte abgeschnitten.

Um dieses Problem zu lösen, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Verfahren entwickelt. Eines ist das *Topical Cooling*, bei dem das Organ in einem Eisbad gekühlt wird (45). Mit dieser einfachen Technik können Ischämiezeiten von 4 - 6 Stunden erzielt werden.

Eine technisch sehr schwierige Konservierungsmethode wurde 1987 von HARDESTY vorgestellt: der normotherme autoperfundierte Herz-Lungen-Block (36). Diese Technik wurde aufgrund ihrer Komplexität und der Tatsache, dass damit keine Verlängerung der tolerablen Konservierungszeit zu erzielen war, wieder verlassen.

Des Weiteren wurde das *Donor Core Cooling* angewendet. Dabei wird die Körpertemperatur des Spenders mittels kardiopulmonalem Bypass auf eine Temperatur von 8 – 10 °C gekühlt (101). Der große Aufwand und die Kosten für

diese Art der Konservierung haben dazu geführt, dass diese Methode weltweit nur von einem Zentrum eingesetzt wird.

Die heutzutage am weitesten verbreitete Methode ist die sogenannte *Single Flush*-Perfusion, die auch bei unseren Versuchen eingesetzt wurde. Dabei wird das Organpaket über die Pulmonalarterie mit einer Konservierungslösung gespült.

Auch bei der Zusammensetzung dieser Lösung fand in den letzten Jahren eine deutliche Entwicklung statt. Die am häufigsten benutzte Lösung ist die Euro-Collins-Lösung. Diese wurde ursprünglich für die Konservierung der Niere entwickelt und konnte dabei auch bis zu einer Ischämiezeit von 30 Stunden mit großem Erfolg eingesetzt werden (17). Wurde Euro-Collins bei der Transplantation einer Lunge verwendet, konnten ebenfalls gute klinische Resultate erzielt werden, allerdings mit wesentlich kürzeren Ischämiezeiten (6,55). Ein großes Problem bei der Anwendung von Euro-Collins ist jedoch deren Konzeption als hochkaliumhaltige Lösung vom intrazellulären Typ. Dadurch sollte eine Elektrolytverschiebung während der Dauer der Ischämie und damit die Entwicklung eines Ödems vermieden werden. Es stellte sich aber heraus, dass Kalium als potenter Vasokonstriktor wirkt und dadurch die gleichmäßige Verteilung der Konservierungslösung erheblich behindert (53). Die Folge ist eine mangelnde Präservierung des Gesamtorgans.

Eine weitere intrazellulär ausgerichtete Lösung ist die *University of Wisconsin*-Lösung (UW), die 1988 zum ersten Mal vorgestellt wurde (10). Dabei wurde Hydroxyethylstärke als Kolloid zur Verhinderung des Ödems hinzugefügt sowie ein Radikalfänger zur Neutralisation entstehender freier Radikale. Im Vergleich zu Euro-Collins konnten damit bessere Ergebnisse erzielt werden (1,11,84). Die guten Resultate wurden vor allem auf die Zugabe der Kolloide zurückgeführt (1,35,84) und hatten zur Folge, dass UW heute die am zweithäufigsten verwendete Lösung in der Lungentransplantationschirurgie ist. Doch auch hier

treten die durch den hohen Kaliumgehalt bedingten Probleme auf, also vor allem ein Vasospasmus der Pulmonalgefäße.

Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung der sogenannten extrazellulären Konservierungslösungen.

Ein Ergebnis dieser Entwicklungen ist eine Niederkalium-Dextranlösung. Dabei wird durch Zugabe von niedermolekularen Dextranen als kolloidale Substanzen sowohl die Entwicklung eines interstitiellen als auch eines intrazellulären Ödems effektiv verhindert (49,88,102). Bereits 1985 konnten damit in Tiermodellen Ergebnisse erzielt werden, die eine Überlegenheit gegenüber Euro-Collins nahe legten (27). Auch in weiteren Tiermodellen, bis hin zu Schweinen als Versuchsobjekten, konnten mit dieser extrazellulären Komposition hervorragende Ergebnisse bei Ischämiezeiten bis zu 24 Stunden erzielt werden (87,88). Die in diesen Versuchen verwendete Lösung ist inzwischen unter dem Namen Perfadex[®] kommerziell erhältlich.

Eine weitere Lösung mit extrazellulärem Ionengehalt stellt Celsior[®] dar. Ursprünglich für den Einsatz in der Herztransplantation entwickelt, wurde bei der Zusammenstellung dieser Komposition, im Vergleich zu Perfadex[®], das Hauptaugenmerk auf die Zugabe effektiver Sauerstoffradikalfänger gerichtet. Dabei wurde, nachdem bereits einige Substanzen auf ihre Effektivität hierfür getestet worden waren (22,33,60,62,69,73), Glutathion als Hauptradikalfänger eingesetzt. Auch hierbei konnten in Tierversuchen hervorragende Ergebnisse erzielt werden, die eine Überlegenheit sowohl gegenüber Euro-Collins (8,97) als auch im Vergleich mit UW (8,83) als etablierten Lösungen zeigten.

Die beiden letztgenannten Lösungen stellen damit die experimentell mit dem grössten Erfolg eingesetzten Kompositionen dar.

1.2. Geschichte der Lungentransplantation

Die erste experimentelle Herz-Lungentransplantation führte DEMIKHOV 1946 durch. Das Versuchstier überlebte 9 Stunden und 26 Minuten. Kurz darauf transplantierte DEMIKHOV die erste Einzellunge (57).

Im Jahr 1963 wurde von HARDY die erste klinische Transplantation einer Lunge am Menschen durchgeführt (37). Der Patient verstarb 18 Tage nach der Operation an Nierenversagen.

Die ersten klinischen Anwendungen der Technik mit andauerndem Erfolg wurden im Jahr 1982 publiziert. REITZ berichtete über 3 Patienten, bei denen eine Herz-Lungentransplantation durchgeführt worden war und die auch ein akzeptables Langzeitüberleben aufwiesen (80). Eine Patientin überlebte für über 17 Monate nach der Transplantation (79). Indikationen für diese Operationen waren ein primärer pulmonaler Hochdruck sowie ein angeborener Herzfehler mit nachfolgender pulmonaler Hypertonie.

1986 gelang es der TORONTO LUNG TRANSPLANTATION GROUP, eine Einzellunge erfolgreich zu verpflanzen (89). Dies bot den Vorteil, die durch das bisher mittransplantierte Herz verursachten Komplikationen (z.B. Abstoßungsreaktionen) zu vermeiden. Außerdem stand dieses Herz nun noch für einen anderen Empfänger zur Verfügung.

Beim Emphysem oder bei der zystischen Fibrose war und ist eine einzelne transplantierte Lunge allerdings nicht sinnvoll, da sie entweder von der weiter an Volumen zunehmenden kontralateralen Lunge zusammengedrückt wird oder diese eine ständige Quelle von Infektionserregern darstellt. 1988 wurde daher die erste klinische Doppel-Lungentransplantation durchgeführt (72). Auch diese Patientin mit Emphysem bei α 1-Antitrypsinmangel konnte postoperativ wieder ein normales Leben führen.

Bereits zu dieser Zeit nahm die Lungentransplantation einen wachsenden klinischen Stellenwert ein, so dass 1987 die „Ära der erfolgreichen Transplantation für Lungenkrankheiten im Endstadium“ eingeläutet wurde (18). Seitdem hat die Zahl der transplantierten Lungen stetig zugenommen. 1990 wurden 184 Einzel- oder Doppellungen verpflanzt. 2001 sind 1400 Einzel- und Doppel- Lungentransplantationen durchgeführt worden. Insgesamt wurden bereits etwa 7200 Einzellungen und mehr als 5400 Doppellungen weltweit verpflanzt (43). Diese Zahlen zeigen, dass die Lungentransplantation inzwischen in der Klinik ihren Platz gefunden hat.

Dabei liegen die 1- bzw. 2- Jahres-Überlebensraten sowohl für Einzellungen als auch für Doppellungen heute bei über 70 bzw. 60% (38,43). 82% der überlebenden Transplantierten haben ein Jahr nach der Operation keine Einschränkungen mehr im täglichen Leben. Nach 3 Jahren steigt die Zahl sogar auf fast 90% (43).

Durch dieses Verfahren kann Menschen, die an terminalen Erkrankungen der Lungen leiden, genauso geholfen werden, wie Menschen mit Erkrankungen der Niere, der Leber oder des Herzens, bei denen die Transplantation schon vor der ersten Verpflanzung der Lunge möglich war. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung der Lungentransplantation das Risiko für die Patienten, an ihrer pulmonalen Erkrankung zu sterben, deutlich gesenkt werden kann (31).

Indikationen für eine Lungentransplantation sind das Emphysem, die zystische Fibrose, die idiopathische fibrosierende Alveolitis oder primärer pulmonaler Hochdruck (38,43,71).

1.3. Entwicklung der Konservierungstechniken

Seit die Lungentransplantation Ende der 80er Jahre einen rasanten Aufschwung erfahren hat, wurden viele Versuche unternommen, die Konservierung des Organs zu optimieren. Vor 1985 wurden dabei die Spender zur Herz-Lungentransplantation in die Klinik des Empfängers gefahren, um lange Ischämiezeiten zu vermeiden (39). Auch die kontinuierliche Perfusion der Spenderlunge über 4 Stunden wurde versucht. Es wurden jedoch bereits experimentell schlechte Ergebnisse erzielt, so dass eine klinische Anwendung nicht in Erwägung gezogen wurde (39).

In den Transplantationsprogrammen wurden seither 4 verschiedene Techniken verwendet:

1. *Topical Cooling*
2. Autoperfusion der Lunge
3. *Donor Core Cooling*
4. *Single Flush-Perfusion*

Die erste Methode, über deren erfolgreichen Einsatz berichtet wurde, war das *Topical Cooling*, bei dem die Organe topisch gekühlt werden (45). Diese Technik wurde 1986 von der TORONTO LUNG TRANSPLANTATION GROUP bei 2 Patienten eingesetzt. Die damit erreichbare Ischämie betrug 4 bis 6 Stunden. Inzwischen wird allerdings auch dort eine andere Technik angewendet (54). Es wurden weitere Verbesserungen dieser Technik gesucht, beispielsweise die Lagerung in kalter Luft anstelle des Eisbads, die jedoch auch nicht den erhofften Erfolg brachten (56).

1987 berichtete HARDESTY über den Einsatz eines normothermen autoperfundierten Herz-Lungen-Blocks bei 30 Patienten (36). In 6 Fällen scheiterte die Präparation jedoch schon vor der eigentlichen Transplantation aufgrund technischer Probleme. 4 weitere Organblöcke wurden aus anderen

Gründen aus der Studie entfernt. Bei den restlichen 20 Patienten war die Konservierung der Organe in 14 Fällen zufriedenstellend. 6 Empfänger starben aufgrund myokardialer Insuffizienzen bzw. Infektionen noch in der Frühphase nach der Operation. Insgesamt konnte jedoch keine Verlängerung der tolerablen Ischämiezeit über 4 - 6 Stunden erreicht werden (36). Diese Technik, die schon 1912 von STARLING und KNOWLTON entwickelt und als Starling-Präparation bekannt wurde (57), wird heute von keinem Transplantationszentrum mehr angewendet (41). Gründe hierfür sind vor allem die technische Komplexität und die Tatsache, dass ein Aufteilen von Herz und Lunge auf verschiedene Empfänger bei dieser Technik nicht möglich ist.

Eine Konservierungsmethode, die auch heute noch von einer Gruppe verwendet wird, ist das *Donor Core Cooling*. Dabei wird der Spender mittels kardiopulmonalem Bypass auf eine Temperatur von 8 – 10 °C abgekühlt. Die Ischämiezeit, die damit bei den ersten 164 Transplantaten erreicht wurde, betrug ca. 3 Stunden (101). Es ergeben sich einige Vorteile aus der Art der Konservierung. So ist z.B. durch das kontrollierte Abkühlen mittels einer Herz-Lungen-Maschine eine Organentnahme ohne Zeitdruck möglich, auch werden andere Organe bereits mitkonserviert. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Nachteilen. Die Komplexität sowie der extrem hohe technische Aufwand und die damit verbundenen hohen Kosten sind wohl die schwerwiegendsten. Des Weiteren ist die Kühlung der Lunge im Vergleich mit der *Single Flush*-Perfusion relativ ineffizient (54).

Die Technik, die heutzutage von fast allen Zentren verwendet wird, ist die *Single Flush*-Perfusion. Dabei wird die Lunge bei der Organentnahme mit einer Konservierungslösung perfundiert. Dies kann entweder antegrad über die *Arteria pulmonalis* oder retrograd über den linken Vorhof geschehen. Es stehen hierfür verschiedene Lösungen und Vorbehandlungen zur Verfügung. So werden beispielsweise Prostaglandine vor der Perfusion infundiert, um eine Relaxation der glatten Muskulatur und damit eine bessere Verteilung der

Lösung zu erreichen. Die klinisch momentan am weitesten verbreitete Konservierungslösung ist Euro-Collins (41).

1.4. Entwicklung der Konservierungslösungen

Seit sich die *Single Flush*-Perfusion als für die Lungentransplantation bevorzugtes Verfahren etabliert hat, wurden viele verschiedene Lösungen mit dem Ziel entwickelt, die mögliche Ischämiezeit weiter zu verlängern und Schäden des Organs zu minimieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Lösungen vom intrazellulären Typ gegenüber extrazellulären Zusammensetzungen getestet. Es wurden verschiedene Techniken der Applikation, antegrad versus retrograd, getestet (15,16,96). Außerdem wurden verschiedene Zusätze zu den Lösungen wie impermeable Substanzen, Adenosin und Radikalfänger, sowie Vorbehandlungen der Spender durchgeführt. Ein optimales Vorgehen wurde allerdings noch nicht gefunden. Dies zeigt sich unter anderem daran, dass es heutzutage unwahrscheinlich ist, dass 2 Transplantationszentren genau dieselbe Technik bei der Organverpflanzung benutzen (54).

Es gibt 5 Grundsätze, an denen sich die Entwicklung einer modernen Lungenkonservierungslösung orientieren muss (10):

1. Minimierung der hypothermieinduzierten Zellschwellung
2. Prävention intrazellulärer Azidose
3. Vermeidung der Ausbreitung des Interstitiums während der Organperfusion
4. Verhinderung der Schädigung durch freie Radikale
5. Bereitstellung von Substraten zur Regeneration der Energieträger

Die Zellschwellung bei Hypothermie kommt dadurch zustande, dass die Na^+ - K^+ -Pumpe inhibiert wird (52). Es kommt zur verminderten Entfernung von Natrium-Ionen aus der Zelle. Folge ist, dass der kolloidosmotische Druck der intrazellulären Proteine und osmotisch wirksamen Substanzen nicht mehr ausgeglichen werden kann. Durch die osmotische Wirkung der Ionen gelangt

Wasser in die Zelle und diese schwillt an. Um den Effekt zu verhindern, werden in Konservierungslösungen Substanzen eingesetzt, die nicht durch die Zellmembran diffundieren können. Die Konzentration dieser Substanzen ist so gewählt, dass sie dem kolloidosmotischen Druck der Proteine im Zellinneren entspricht.

Zur intrazellulären Azidose kommt es bei der Organkonservierung durch die Ischämie des Organs. Wird eine Zelle nicht genügend mit Sauerstoff versorgt, um ihren aeroben Stoffwechsel aufrechterhalten zu können, wird vermehrt der Weg der anaeroben Glykolyse beschritten. Laktat wird produziert. Durch die so entstandene Azidose können die Lysosomen instabil werden und ihre Enzyme freisetzen. Die Mitochondrien können Veränderungen unterworfen werden. Die Vermeidung der Azidose erfolgt in der Perfusionslösung durch die Wahl eines geeigneten Puffersystems.

Enthält eine Konservierungslösung keine Substanzen, die im Zielorgan onkotischen Druck aufbauen, kommt es zur schnellen Diffusion der Bestandteile der Lösung ins Interstitium, eventuell schon während der Perfusion. Dies führt zu einem Gewebsödem, das eine Kompression der Kapillaren, eine dadurch bedingte schlechte Verteilung der Lösung im Organ und eine suboptimale Konservierung zur Folge hat. In modernen Konservierungslösungen wird diesem Problem durch den Einsatz von Substanzen entgegengewirkt, die onkotischen Druck aufbauen und damit eine Diffusion ins Gewebe verhindern.

Ein wichtiger Punkt, auf den später noch genauer eingegangen werden muss, ist die Schädigung des Transplantats durch freie Sauerstoffradikale, die während der Ischämiephase und im Laufe der Reperfusion des Organs gebildet werden. Um diese sehr reaktiven Moleküle abzufangen, enthalten neuere Lösungen Radikalfänger, die der gebrauchsfertigen Lösung beigemischt sind.

Der letzte Punkt, auf den besonderen Wert gelegt werden muss, ist die Bereitstellung von Grundbausteinen des Energiestoffwechsels. Im Lauf der

hypothermen Lagerung verarmen die Organe stark an Adenosintriphosphaten (ATP), den Energieträgern der Zelle. Dies kommt dadurch zustande, dass die Endprodukte des ATP-Abbaus, Adenosin, Inosin und Hypoxanthin, frei durch die Zellmembran permeieren können und der Zelle so verloren gehen. Ein wichtiger Punkt bei der Reperfusion des Organs ist allerdings die Reaktivierung der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe, um das Flüssigkeitsgleichgewicht der Zelle wieder aufbauen zu können. Dazu wird viel Energie benötigt. Die Bereitstellung von ATP-Vorgängermolekülen, aus denen die Zelle schnell wieder Energieträger aufbauen kann, ist somit eine weitere Aufgabe der Konservierungslösung (10).

Die erste klinisch etablierte und doch immer noch häufig verwendete Lungenkonservierungslösung ist Euro-Collins. Diese Lösung wurde ursprünglich für die Konservierung der Niere entwickelt. Für diesen Verwendungszweck konnten bereits 1969 gute Ergebnisse für Ischämiezeiten bis 30 Stunden erzielt werden (17). Der erste klinische Einsatz in der Lungentransplantation wurde 1984 von JAMIESON *et al.* berichtet, allerdings mit sehr kurzen Ischämiezeiten (46). Nachdem 1986 mit 60 ml/kg Körpergewicht experimentell die optimale Menge an Perfusat gefunden worden war, wurde von BALDWIN *et al.* Euro-Collins 1987 zur klinischen Konservierung bei einer kombinierten Herz-Lungentransplantation benutzt. Die Ischämiedauer des Organblocks betrug dabei über 3 Stunden. 9 Monate nach dieser Operation war die Patientin immer noch wohlauf und zeigte sehr gute Lungenfunktionswerte (6). Die guten klinischen Ergebnisse konnten 1990 von KIRK *et al.* noch einmal bestätigt werden. Diese hatten Euro-Collins bei 22 Lungen- bzw. Herz-Lungentransplantationen verwendet. Die durchschnittliche Ischämiedauer betrug dabei 3,5 Stunden. Auch in dieser Studie zeigte sich nach Konservierung mit Euro-Collins ein gutes klinisches Resultat mit zufriedenstellenden Röntgenaufnahmen, nur kurzer Nachbeatmungsperiode und verbesserter Oxygenationsfähigkeit im Lauf der ersten postoperativen Woche (55).

Überprüft man die obengenannten 5 Grundsätze für die Zusammenstellung einer Konservierungslösung, so findet sich in der Euro-Collins-Lösung Glukose

als impermeable Substanz. Als Puffer findet Natriumbicarbonat Anwendung. Kolloide oder andere Substanzen zur Erhöhung des kolloidosmotischen Drucks sind jedoch nicht enthalten. Auch finden sich in dieser Komposition keine Radikalfänger, um Schäden durch freie Radikale zu vermeiden.

Euro-Collins ist eine sogenannte intrazelluläre Komposition. Deren Ionenzusammensetzung gleicht den intrazellulären Verhältnissen. Das bedeutet, dass es sich hierbei um eine hoch kaliumhaltige Lösung handelt. Die Idee, die hinter dieser hohen Konzentration an Kalium steckt, ist, dass dadurch der Ionenaustausch über die Zellmembran vermindert wird. Dadurch ließe sich einem Zellödem vorbeugen (17). Auch sollte durch den geringen zellulären Verlust von Ionen nach Wiederherstellung der Perfusion Energie gespart werden, da die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe nicht erst das Ionengleichgewicht wiederherstellen muss. Es zeigte sich jedoch, dass Kalium ein potenter Vasokonstriktor ist (53). Hoch kaliumhaltige Konservierungslösungen verursachen also eine starke Vasokonstriktion im zu konservierenden Organ. Dies resultiert in schlechterer Verteilung der Konservierungslösung mit nachfolgender suboptimaler Kühlung und Konservierung der Lungen (53). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird die Spenderlunge heutzutage mit Prostaglandinen vorbehandelt. Auch modifizierte Lösungen mit niedrigerem Kaliumgehalt sind schon erforscht worden. Dabei konnten experimentell bessere Ergebnisse erzielt werden als mit der ursprünglichen Lösung. Es ergaben sich niedrigere Werte beim pulmonalarteriellen Widerstand, verbesserte Oxygenierungswerte und ein niedrigerer Nass/Trockengewichtsquotient. Dies spricht für eine bessere Konservierung der Lunge (29).

Ende der 80er Jahre berichtete die PAPWORTH-GRUPPE vom klinischen Einsatz ihrer eigenen Lösung auf der Basis von Blut. Es handelt sich hierbei um eine extrazelluläre Komposition mit hoher Osmolarität zur Verhinderung des interstitiellen Ödems. Dafür wurde Mannitol hinzugefügt, das auch als Radikalfänger dient. Durch die Blutbasis ist schon die Grundlage zur

Pufferkapazität gelegt (34). 10 der 14 Empfänger eines Herz-Lungentransplantats erfreuten sich auch Monate nach der Operation noch guter Gesundheit (34). Es wurden jedoch nur Ischämiezeiten bis maximal 3 Stunden in der Studie verwertet. Im direkten Vergleich mit Euro-Collins zeigt sich dann auch nach 6stündiger Ischämie eine geringere Compliance und eine höhere Wasseraufnahme während der Reperfusion in der Gruppe mit der Papworth-Lösung (67).

1988 stellte BELZER zum ersten Mal seine *University of Wisconsin-Lösung* (UW) vor. Damit konnten die möglichen Ischämiezeiten von Niere, Leber und Pankreas deutlich verlängert werden (45,76,93). UW enthält Lactobionat und Raffinose zur Prävention der Zellschwellung. Zur Pufferung der entstehenden Azidose dient ein Phosphatpuffer. Hydroxyethylstärke als Kolloid soll das interstitielle Ödem verhindern. Als Radikalfänger wurde Glutathion hinzugefügt, Allopurinol hemmt die Xanthinoxidase und verhindert so bereits die Bildung von Sauerstoffradikalen. Als Vorstufe von Energieträgern ist das enthaltene Adenosin gedacht (10). Mit dieser Lösung konnten tierexperimentell Ergebnisse erzielt werden, die bei gleicher Ischämiezeit eine Überlegenheit gegenüber Euro-Collins nahe legten (1,11,84). Dabei zeigte sich besonders ein verbesserter Gasaustausch sowie eine geringere Produktion von Lipidperoxiden, die durch Reaktion von Membranlipiden mit freien Sauerstoffradikalen entstehen (1,11). Auch klinisch erwies sich diese Lösung als der bisherigen Standardlösung Euro-Collins überlegen. HARDESTY *et al.* berichteten 1993 von signifikant verlängerter Ischämiezeit bei gleichzeitig verringerter Schädigung des Organs im Vergleich von 100 Transplantaten, die im Studienzeitraum durchgeführt worden waren. Dabei wurden 70 Organe mit UW und 30 mit Euro-Collins konserviert (35). D'ALESSANDRO *et al.* beschrieben 1994 14 Einzel- und Doppellungentransplantationen unter Verwendung von UW. Davon überlebten 12 Patienten den Eingriff ohne eine Episode pulmonaler Dysfunktion. Die Ischämiezeiten betrug dabei bis zu 9,5 Stunden (19).

1995 verglich RINALDI die Funktion der Transplantate bei insgesamt 31 mit Euro-Collins bzw. mit UW konservierten Lungen. Auch hierbei zeigte sich bei verlängerter Ischämiezeit ein besserer Gasaustausch in der UW-Gruppe (82). Die besseren Ergebnisse werden dabei überwiegend auf die Zugabe der osmotischen Substanzen zurückgeführt (1,35,84). Dadurch kann das entstehende zelluläre und interstitielle Ödem offenbar besser verhindert werden als mit Euro-Collins, wodurch der Gasaustausch an der alveolo-kapillären Membran nach der Reperfusion des Organs deutlich weniger behindert wird. Auch wurde vermutet, dass durch die höhere Viskosität von UW eine homogenere Perfusion des Spenderorgans erreicht werden kann (35).

Doch auch UW ist eine intrazelluläre Konservierungslösung mit hohem Kaliumgehalt. Da auch hier, wie bei Euro-Collins, ein Vasospasmus der Pulmonalgefäße auftritt, wurden 1991 von OKA *et al.* Versuche mit einer niederkaliumhaltigen UW-Lösung durchgeführt. Dabei zeigt sich eine Überlegenheit dieser dem extrazellulären Milieu gleichenden Lösung gegenüber der herkömmlichen Komposition (68). Heute ist UW die am zweithäufigsten benutzte Konservierungslösung in der Lungentransplantationschirurgie (41).

Weitere Lösungen mit extrazellulärer Ionenkonzentration sind die Niederkalium-Dextranlösungen (LPD), zu denen auch Perfadex[®] sowie Celsior[®] gehören.

1.5. Komposition von Celsior® und Perfadex®

Beide in dieser Arbeit getesteten Konservierungslösungen stellen Kompositionen vom extrazellulären Typ dar.

Die erfolgreiche Präservation einer Hundelunge mit einer solchen Lösung wurde erstmals von FUJIMURA und Mitarbeitern 1985 publiziert. Dabei konnte eine gute strukturelle Beschaffenheit des Transplantats nach 24stündiger Ischämie röntgenologisch gezeigt werden. Die extrazelluläre Lösung erwies sich als der intrazellulären hierbei überlegen (27). Mit einer solchen phosphatgepufferten Lösung, die bereits 2% niedermolekulare Dextrane enthielt, konnten auch bei 48stündiger Ischämie noch gute Resultate erzielt werden (26). Auch von KESHAVJEE 1989 und YAMAZAKI 1990 wurde in einem weiteren Vergleich mit Euro-Collins ein besseres Ergebnis mit der extrazellulären Lösung erreicht (49,102). 1 Jahr später konnte von OKA *et al.* gezeigt werden, dass die Niederkalium-Dextranlösung (LPD) sowohl Euro-Collins als auch der herkömmlichen UW-Lösung überlegen war. Einzig eine Niederkalium-UW erbrachte vergleichbare Ergebnisse (68). Versuche aus Toronto, die LPD mit EC-ähnlicher Niederkaliumlösung und Dextranlösungen mit hoher Kaliumkonzentration verglichen, zeigten, dass die besten Resultate mit LPD zu erzielen waren (50).

1993 wurde dann von STEEN *et al.* dieser Ansatz wieder aufgegriffen und die erfolgreiche Anwendung einer Niederkalium-Dextranlösung (LPD) in einem Schweinmodell veröffentlicht. Die Ischämiezeit dieser Studie betrug 12 Stunden (88). Auch mit einer Lagerung der perfundierten Organe über 24 Stunden war der Einsatz dieser Lösung vereinbar (87). Die hierbei verwendete Komposition ist mittlerweile unter dem Namen Perfadex® kommerziell erhältlich.

Überprüft man, wie die bereits erwähnten Grundsätze einer Konservierungslösung in Perfadex® verwirklicht sind, so stellt sich heraus, dass die enthaltenen Dextrane sowohl der Zellschwellung als auch dem interstitiellen

Ödem vorbeugen (49,88,102). Zur Vermeidung einer intrazellulären Azidose enthält die Lösung einen Phosphatpuffer (49).

Auf einen Sauerstoffradikalfänger wurde in dieser Lösung verzichtet. Dennoch konnte gezeigt werden, dass durch die Lungenkonservierung mit LPD der oxidative Lungenschaden während der Reperfusion durch eine verminderte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Vergleich mit Euro-Collins vermindert werden konnte (40). Der Mechanismus dieses Effekts ist jedoch nicht klar. Auf die Zugabe von Adenosin oder ähnlichen ATP-Vorläufermolekülen wurde ebenso verzichtet. Durch die Verhinderung der Zellschwellung ist der Bedarf an Energieträgern nach der Reperfusion nicht so groß wie bei anderen Lösungen (88).

Des Weiteren ist bekannt, dass Dextrane die Aggregation der roten Blutzellen verhindern und damit die Mikrozirkulation in den Lungengefäßen verbessern können. Hypothermie, an Energieträgern arme Erythrozyten tendieren dazu, zu aggregieren und die kleinen Kapillaren zu verstopfen (50).

Dennoch gibt es auch Studien, die die prinzipielle Überlegenheit der LPD in Frage stellen. 1995 wurde von ALBES und Mitarbeitern gezeigt, dass eine Niederkalium-Euro-Collins-Lösung im Rattenmodell tendenziell eher bessere Ergebnisse erbrachte als LPD (2). Auch von PUSKAS *et al.* wurde erwiesen, dass nach Vorbehandlung der Spender mit einem potenten Vasodilatator, hier Prostaglandin E₁, die Resultate der mit LPD und Euro-Collins konservierten Lungen durchaus vergleichbar waren (77).

Es ist jedoch noch nicht völlig klar, ob alle Komponenten der Lösung optimal zusammengestellt sind. Die ersten Versuche fanden noch mit 2% Dextrangehalt statt. Inzwischen wurde gezeigt, dass mit einer Konzentration von 5% bessere Ergebnisse zu erzielen sind (86). Bei höheren Konzentrationen führt die hohe Viskosität zu einer eingeschränkten Mikrozirkulation und inhomogener Verteilung der Lösung (2). Auch ist nicht klar, ob Dextrane mit einem

Massengewicht von 40000 Dalton das Optimum darstellen. Von FUKUSE *et al.* wurde 1995 gezeigt, dass höhermolekulare Dextrane mit 160000 Dalton eine bessere Konservierung ermöglichen. Dies wurde damit erklärt, dass im Zustand gesteigerter vaskulärer Permeabilität, z.B. bei Reperfusion nach Ischämie, Moleküle mit 40000 Dalton MG ins Interstitium gelangen können und dort das Ödem eher noch verschlimmern (28).

Bei der Zusammenstellung von Celsior[®] hingegen wird auf den Sauerstoffradikalfänger am meisten Wert gelegt. Um die bei der Reperfusion des konservierten Organs entstehenden freien Radikale abzufangen, wurden schon eine ganze Reihe von Substanzen experimentell getestet (22,33,60,62,69,73). Dabei konnte stets gezeigt werden, dass der Zusatz einer solchen Komponente zur normalerweise verwendeten Konservierungslösung eine Verbesserung des Ergebnisses erbrachte. Von MENASCHÉ wurde bereits 1986 über die experimentelle Verwendung von Peroxidase, Glutathion und Superoxid-Dismutase berichtet (60), während PAULL und Mitarbeiter 1989 Katalase und Superoxid-Dismutase verglichen (73). HAJJAR *et al.* verwendeten 1987 Katalase und Allopurinol (33), DETTERBECK konnte mit Dimethyl-Harnstoff als Zusatz 1990 der reinen Euro-Collins-Konservierung überlegene Resultate erreichen (22). 1993 bewies Glutathion seine Überlegenheit gegenüber N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (62). Auch die Kombination von NAC und Glutathion brachte eine Verbesserung in einem Zellkulturmodell gegenüber einer Vergleichslösung (85). OKUBO *et al.* brachten 1997 schließlich mit Thioredoxin wieder eine neue Substanz ins Spiel (69). Alle bis heute geprüften Substanzen hier aufzuführen ist unmöglich.

Bei der Zusammenstellung der ursprünglich für die Konservierung des Herzens entwickelten Celsior[®]-Lösung wurde schließlich reduziertes Glutathion als Hauptradikalfänger eingesetzt. Grund dafür war unter anderem die Tatsache, dass Glutathion auf 3 verschiedenen Wegen der Schädigung des Organs durch freie Radikale vorbeugt. So ist es ein Ko-Faktor von Peroxidase, einem Enzym, das Hydrogenperoxid inaktiviert. Es hält des weiteren Sulfhydrylgruppen von

Enzymen im reduzierten Zustand und erhält so deren Aktivität. Außerdem ist Glutathion selbst in der Lage, Sauerstoffradikale zu inaktivieren (63). Auch die Extravasation von neutrophilen Granulozyten, einer Quelle freier Radikale, kann durch Glutathion direkt beeinflusst werden (13).

Andererseits nimmt der endogene GSH-Gehalt während myokardialer Ischämie ab, so dass ein Ersatz dieser Substanz nötig scheint, um die natürliche Abwehr gegen die Radikale wieder herzustellen (63).

MENASCHÉ und Mitarbeiter publizierten bereits 1986 den erfolgreichen Einsatz von GSH als Zusatz zu einer kardioplegen Lösung, wenn auch der Schutz mit Peroxidase etwas besser war (60). Ein Problem bei der Verwendung von GSH ist, dass diese Substanz bei Kontakt mit Luft sehr schnell oxidiert und dadurch nicht nur ihre schützende Wirkung verliert, sondern sogar zytotoxisch wird. Die Instabilität von GSH selbst während der Lagerung der Lösung konnte 1989 bei der Untersuchung von UW, die ja auch in geringerer Menge GSH enthält, nachgewiesen werden (4). Von GNAIGER *et al.* wurde 2000 gezeigt, dass die Stabilität von GSH etwas größer ist, wenn es in Celsior[®] anstelle von UW enthalten ist (32). Auch MENASCHÉ war sich dieses Problems bewusst (63). Bei Celsior[®] wird die Stabilität aller Komponenten bei fachgerechter Lagerung über neun Monate garantiert.

Um den allgemeinen Grundsätzen einer Konservierungslösung gerecht zu werden, enthält Celsior[®] Mannitol und Lactobionat als impermeable Substanzen, um eine Zellschwellung zu verhindern. Als Radikalfänger dienen neben GSH noch Mannitol sowie Histidin, eine Aminosäure. Die Effektivität dieser Antioxidantien wurde bereits experimentell belegt (75). Zur Wiederherstellung energiereicher Phosphatverbindungen nach der ischämischen Phase wurde Glutamat hinzugefügt. Als Puffersubstanz dient Histidin. Zusätze, die spezifisch auf die Verhinderung des interstitiellen Ödems hinzielen, wurden nicht verwendet.

Eine Besonderheit der Lösung, die durch ihre ursprüngliche Entwicklung als Herz-Konservierungslösung bedingt ist, ist das Verhältnis der Elektrolyte. Celsior® enthält einen niedrigen Kalziumgehalt und zusätzlich Magnesium. Dadurch soll eine Überladung der Zelle mit Kalzium und daraus folgende Kontraktur verhindert werden (62). Bereits 1983 konnte gezeigt werden, dass dadurch die myokardiale Erholung nach Ischämie verbessert werden kann (74). Im Vergleich mit St. Thomas-Lösung, einer Standardlösung zur Erzeugung einer Kardioplegie, zeigten mit Celsior® perfundierte Herzen postischämisch eine deutlich bessere *Compliance* und bessere kontraktile Funktion (51,64). Dies führte dazu, dass Celsior® klinisch zur Herztransplantation bereits eingesetzt wird (64). Auch zur Präservierung von Nieren wurde Celsior® bereits erfolgreich eingesetzt (5).

In der Lungentransplantation kann durch die Zugabe von GSH zur Konservierungslösung das Ergebnis verbessert werden. So zeigte sich ein reduziertes pulmonales Ödem, geringere Nass/Trockengewichtsquotienten und eine weniger ausgeprägte Lipidperoxidation bei einem Vergleich von EC und EC + GSH (12). Ebenso konnte eine geringere Konzentration von neutrophilen Granulozyten im Gewebe sowie eine verringerte Permeabilität der Lungengefäße nachgewiesen werden (13). Bei diesen Studien wurde auch festgestellt, dass durch die Lagerung in einer GSH-haltigen Lösung die Konzentration an GSH im Gewebe vor der Reperfusion, wo die Radikalfänger am meisten gebraucht werden, deutlich gesteigert werden kann (12). Dies legt nahe, dass durch diese Technik ein besserer Schutz des Organs vor Schäden durch freie Sauerstoffradikale erreicht werden kann.

Im direkten Vergleich mit bereits erprobten Lungenkonservierungslösungen zeigten sich bei Verwendung von Celsior® stets gute Ergebnisse. So war bei einem Vergleich mit der Papworth-Lösung der Filtrationskoeffizient in der Celsior®-Gruppe deutlich weniger erhöht als in der Papworth-Gruppe (78). Auch gegenüber Wallwork-Lösung konnte nachgewiesen werden, dass sich mit Celsior® nach einer Ischämiezeit von 5 Stunden im Kleintiermodell eine bessere

Oxygenierung erzielen lässt (100). Im Vergleich mit UW und Euro-Collins zeigten sich der Konservierung mit EC gegenüber verbesserte Werte bei der Oxygenierung, vaskulärer Permeabilität, *Compliance* und Nass/Trockengewichtsquotient (8,97). Gegenüber UW konnte allerdings erst nach längerer Ischämie eine Verbesserung nachgewiesen werden (8,83). Auch die Lungenstruktur ist mit Celsior[®] postischämisch besser konserviert als bei Verwendung von Euro-Collins als Konservierungslösung (25). So konnte gezeigt werden, dass das stereologisch bestimmte Volumen von Alveolen und Azini und damit die Gasaustauschfläche deutlich höher ist (24). In einer Kleintierstudie konnte im Vergleich mit Perfadex[®] nach einer Ischämiezeit von 4 Stunden ein niedrigerer pulmonalarterieller Druck und eine bessere Oxygenierungsfähigkeit der mit Celsior[®] konservierten Organe gezeigt werden (99).

Es zeigt sich, dass es sich bei Perfadex[®] und Celsior[®] um die momentan experimentell erfolgreichsten Lungenkonservierungslösungen handelt. Daher erschien ein Vergleich speziell dieser beiden Lösungen in der vorliegenden Studie gerechtfertigt.

1.6. Der Ischämie/Reperfusionsschaden

Bei der Transplantation eines Organs durchläuft dieses 2 Phasen, in denen jeweils unterschiedliche Schädigungsmechanismen auf das Transplantat einwirken. Die erste Phase ist die Phase der Ischämie, als zweite Schädigungsphase kann die Reperfusion angesehen werden.

Die Ischämie bewirkt hauptsächlich eine Depletion des Organs an Sauerstoff und Nährstoffen (7). Der Mangel an Sauerstoff hat zur Folge, dass die Energiegewinnung mit Hilfe der anaeroben Glykolyse stattfinden muss, was zu einer intrazellulären Azidose mit veränderter Enzymkinetik führt (30).

Mit zunehmendem Mangel an Substraten kommt es zu einer progredienten Abnahme an ATP und einer Zunahme an AMP als dessen Abbauprodukt. Der Verlust von ATP als dem Hauptenergieträger der Zelle führt zu einem Ausfall der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe und einem Wassereinstrom in die Zelle, der über eine Schwellung bis zu deren Ruptur führen kann. Ebenso wird die Produktion von *Surfactant* durch den Substratmangel gestört (7). Dadurch geht die durch den *Surfactant* erreichte Reduktion der alveolären Oberflächenspannung verloren, die *Compliance* der Lunge nimmt zu, die Wiederausdehnung der Lunge nach der Reimplantation ist erschwert.

Noch mehr Aufmerksamkeit als der Ischämiephase wird heutzutage allerdings der Reperfusion des transplantierten Organs zugewandt. Dabei können Veränderungen beobachtet werden, die dem Bild einer akuten Entzündung ähneln (14).

Durch Interaktion zirkulierender neutrophiler Granulozyten mit verschiedenen Oberflächenmolekülen auf dem Endothel pulmonaler Kapillaren sowie Zytokinen wie TNF_α kommt es zu einer Adhäsion und nachfolgenden Extravasation dieser Leukozyten in das Interstitium und die Alveolen. Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch TNF_α führt dann wiederum zu einer vermehrten Produktion verschiedener Zytokine wie TNF_α , IL 1 und

Leukotrien B₄, wodurch der Prozess der Chemotaxis und Aktivierung weiterer Leukozyten in Gang gehalten wird. Des Weiteren wird eine Degranulation der polymorphkernigen Zellen bewirkt, welche zur Freisetzung von Proteasen führt, die das umliegende Gewebe direkt schädigen (23,66).

Schließlich tragen diese Zellen noch zu dem Mechanismus bei, der für einen Grossteil des Reperfusionsschadens verantwortlich gemacht wird, der Freisetzung freier Sauerstoffradikale (23,66).

Als freie Sauerstoffradikale werden Sauerstoffmoleküle bezeichnet, die ein ungepaartes Elektron tragen und deshalb chemisch sehr reaktiv sind.

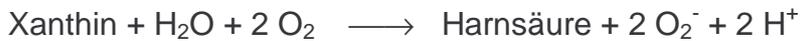
Unter physiologischen Bedingungen werden 95% des Sauerstoffs durch die mitochondriale Cytochromoxidase zu H₂O abgebaut. Die verbleibenden 5% werden einer Reaktionskette zugeführt, die zur Bildung freier Radikale führt. In einem ersten Schritt wird dabei molekularer Sauerstoff zu einem Superoxid-Anion (O₂⁻) umgewandelt, dieses wiederum wird durch die Akzeptanz eines weiteren Elektrons zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (21,61). Durch ein drittes Elektron schließlich entsteht das hochreaktive Hydroxylradikal (OH[•]), das als eines der zytotoxischsten freien Radikale gilt (61). Die so entstandenen Radikale werden unter normalen Bedingungen durch in der Zelle vorhandene Schutzmechanismen abgefangen und unschädlich gemacht (21,61).

Unter den Bedingungen von Ischämie und Reperfusion führen jedoch mehrere Faktoren dazu, dass stark vermehrt freie Sauerstoffradikale gebildet werden.

In ischämischem Gewebe kommt es aufgrund der bereits angesprochenen Verarmung an energiereichen Phosphaten zu einer intrazellulären Kalziumanreicherung (59). Dadurch wird eine Protease aktiviert, die zu einer Konversion des Enzyms Xanthin-Dehydrogenase zu Xanthin-Oxidase führt (59,61,91). Xanthin-Dehydrogenase führt physiologisch zur Umwandlung von Xanthin und Hypoxanthin in folgender Reaktion zu Harnsäure und NADH:



Nach der Umwandlung zu Xanthin-Oxidase reagiert das Xanthin allerdings mit Sauerstoff in folgender Reaktion:



Dabei entstehen also Superoxidanionen, die in den weiter oben beschriebenen Schritten in Hydroxylradikale umgewandelt werden können und zu einer Gewebsschädigung führen. Als besonders deletär erweist sich die Tatsache, dass es durch die Ischämie und die daraus resultierende Abnahme an ATP zu einer Zunahme an dessen Abbauprodukt AMP kommt. Dieses wird dann weiter zu Adenosin, Inosin und Hypoxanthin abgebaut, was ebenso wie Xanthin als Substrat der obigen Reaktion dienen kann (59).

Bereits während der Ischämie kommt es also zu 2 wichtigen Veränderungen im Gewebe, die für die Ausbildung des Reperfusionsschadens bedeutend sind. Zum einen kommt es zur Ausbildung einer neuen Enzymaktivität, der Xanthin-Oxidase. Zum anderen sammelt sich eines der beiden Substrate für die Reaktion an, die durch dieses Enzym katalysiert wird, das Hypoxanthin (59,61,91).

Bei der Reperfusion des Gewebes wird nun das zweite Substrat, der Sauerstoff, dieser Reaktion hinzugefügt. Es kommt zur explosionsartigen Produktion von freien Sauerstoffradikalen.

Eine weitere Folge der Wiederversorgung des Organs mit Blut ist, dass die neutrophilen Granulozyten als wichtige Quelle freier Radikale vermehrt anfallen (61).

Bereits 1983 war bekannt, dass freie Radikale die vaskuläre Permeabilität beeinflussen (70). Verantwortlich für die Schädigung endothelialer und alveolärer Zellen ist dabei vor allem eine Kettenreaktion, die zur Lipidperoxidation von Membranlipiden führt und dadurch eine Schädigung der Zellmembranen bewirkt (21,30,61,91). Dieser Prozess ist durch die Instabilität

der entstehenden Produkte selbstunterhaltend und kann zu ausgedehnten Schädigungen von Zellmembranen führen (91). Des Weiteren führt der Einfluss der freien Radikale zur Denaturierung von Proteinen (30,60) und Schädigungen der DNA (21,30,91). Über eine veränderte Gentranskription und modulierte intrazelluläre Signaltransduktion werden vermehrt zytotoxische Zytokine wie z.B. TNF_α gebildet, die wiederum chemotaktische Effekte haben und zu einer weiteren Verstärkung der Schädigung führen (91).

Eine Schädigung des Endothels der pulmonalen Gefäße hat ein Ungleichgewicht an zytoprotektiven und proinflammatorischen Faktoren zur Folge. Die zytoprotektiven Faktoren führen dabei zur Vasodilatation, vermindern die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und die Aggregation von Thrombozyten. Die Wirkungen der proinflammatorischen Substanzen, die im Falle einer Endothelschädigung überwiegen, sind hingegen vasokonstriktorisch und thrombogen. Auch führen sie zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität. Diese Effekte führen zu einer verstärkten Gewebeschädigung (30,66).

Ein weiterer Zelltyp, der durch die freien Sauerstoffradikale geschädigt wird, sind die alveolären Typ II-Zellen. Diese sind für die Produktion von *Surfactant* zuständig, differenzieren sich zu Typ I-Zellen aus, die die Alveolen auskleiden und sind an der Modulation der alveolären Immunantwort beteiligt. Durch die Störung dieser Zellen kommt es zu einer Veränderung der Zusammensetzung des *Surfactant*, die Verringerung der Oberflächenspannung ist nicht mehr gewährleistet, es kommt zum Kollaps von Alveolen (66).

All diese Veränderungen, die unter der Bezeichnung Ischämie/Reperfusionsschaden zusammengefasst werden, führen zum primären Versagen der Spenderlunge mit der Ausbildung progressiver Hypoxämie, verminderter *Compliance* des Organs und erhöhter Kapillarpermeabilität mit der Entwicklung eines Lungenödems. Diese Schädigungen können postoperativ zu einem komplikationsreichen Verlauf mit

verlängertem Aufenthalt auf der Intensivstation und auch erhöhter Mortalität führen (66). 1998 wurde beispielsweise von RISE *et al.* darauf hingewiesen, dass eine vermehrte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und ein hoher oxidativer Stress mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer *Bronchiolitis obliterans* als Spätfolge der Lungentransplantation verknüpft ist (81). Dieses Syndrom ist immer noch die Hauptursache für ein spätes Organversagen (38).

1.7. Radikalfänger

Um der Schädigung der Zelle durch diese freien Radikale entgegenzuwirken wurden bereits eine ganze Reihe von Substanzen geprüft, welche diese unschädlich machen sollten. Dabei handelte es sich um sogenannte Radikalfänger, enzymatische Hemmer der Produktion von freien Radikalen und Antioxidantien (30).

Als Radikalfänger wurde beispielsweise 1990 von DETTERBECK *et al.* Dimethyl-Harnstoff verwendet, das der Konservierungslösung zugegeben wurde (22). Ebenso kann das auch in Celsior[®] zugesetzte Histidin und Mannitol zu diesem Zweck herangezogen werden. Bereits 1989 wurde von PAULL *et al.* die Kombination Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase benutzt (73), welche die Umwandlung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und dessen weiteren Abbau zu Wasser katalysiert. Diese Stoffe wurden damals bei der Reperfusion der Organe zugegeben.

Sowohl SOD als auch Katalase wurden mit gutem Erfolg zusammen mit Allopurinol eingesetzt (33,42), einem Enzym, das die Fähigkeit besitzt, die Xanthin-Oxidase zu hemmen und damit bereits die Entstehung von Superoxidanionen zu verhindern. Die Verwendung von Allopurinol als einzigem Schutz vor freien Radikalen wurde 1990 von ALLISON *et al.* publiziert (3), auch damit konnten gegenüber der Vergleichsgruppe bessere Ergebnisse im Hinblick auf Kapillarpermeabilität erzielt werden.

Die größte Aufmerksamkeit wird heutzutage allerdings den Antioxidantien gewidmet. Hierbei ist vor allem das Glutathion zu erwähnen.

Reduziertes Glutathion (GSH) trägt eine Thiol-Gruppe, die besonders gut dazu geeignet ist, freie Radikale an sich zu binden und ein oxidiertes Molekül zu bilden. Dabei werden zuerst 2 Glutathion-Radikale gebildet, die sich dann zu einem oxidierten Doppelmolekül (GSSG) zusammenfinden (61).

Bereits 1991 wurden von BRYAN *et al.* in San Antonio Untersuchungen angestellt, die eine klare Verbesserung der postoperativen Situation der Versuchstiere nach der Autotransplantation einer Lunge durch den Zusatz von Glutathion zur Konservierungslösung zeigten (12). Das Ödem des transplantierten Organs war geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, und auch die funktionellen Parameter wiesen bessere Werte auf. 3 Jahre später konnte von der gleichen Arbeitsgruppe außerdem der Nachweis erbracht werden, dass durch den Zusatz von Glutathion zur Konservierungslösung auch die kontralaterale, nichttransplantierte Lunge geschützt werden kann. Dies wurde auf ein Abfangen inflammatorischer Mediatoren durch das Antioxidans zurückgeführt (13). Die Grundlage für diese Ergebnisse lieferten JACKSON *et al.* bereits 1990, als sie herausfanden, dass in Folge der Reoxygenation nach einer ischämischen Phase eines Lungenflügels das oxidierte Glutathion in beiden Lungen stark ansteigt (44). Auch KATZ konnte zeigen, dass in der kontralateralen Lunge der Spiegel an GSSG postoperativ stark ansteigt (47). Er deutete dies als Hinweis darauf, dass in diesem Organ ebenfalls ein ausgeprägter oxidativer Stress auftritt. Diese Tatsache wurde von ihm 1995 als Grund dafür angeführt, diesen Marker in der bronchalveolären Lavage als sensitives Maß für die Stärke der *reperfusion injury* und den oxidativen Stress, unter dem das Organ steht, zu benutzen (48).

Die Notwendigkeit eines externen Zusatzes von reduziertem Glutathion wurde 1996 von BAZ *et al.* aufgezeigt, als er feststellte, dass der Flüssigkeitsfilm auf dem Alveolarepithel der transplantierten Lunge eine geringere Menge dieses wichtigen Stoffes enthielt als bei einer Kontrollgruppe. Dadurch seien die transplantierten Lungen auch anfälliger für oxidative Schäden (9). Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die auch Katz bereits 3 Jahre zuvor erhielt. Auch dort waren die GSH-Spiegel in der transplantierten Lunge niedriger als in der Nichttransplantierten (47). In dieser Veröffentlichung wurde des weiteren darauf hingewiesen, dass es den Zellen möglich ist, extrazelluläres Glutathion in reduziertem Zustand aufzunehmen und intrazellulär zum Schutz der Zelle zu verwenden.

1.8. Fragestellung

In verschiedenen Tiermodellen zur Lungenprotektion stellten sich die modernen Konservierungslösungen mit niedrigem Kaliumgehalt, Perfadex[®] und Celsior[®], im Vergleich zu etablierten Kompositionen als überlegen heraus. Es existieren jedoch keine klinische Studien. Bisher wurde noch von keiner Gruppe ein direkter Vergleich dieser beiden Lösungen durchgeführt.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist, die beiden experimentell erfolgreich eingesetzten Konservierungslösungen für die Transplantation der Lunge einem direkten Vergleich zu unterziehen. Dabei wurde als Versuchsaufbau ein Tiermodell verwendet, das den physiologischen Gegebenheiten bei der klinischen Verpflanzung einer menschlichen Lunge sehr nahe kommt. Zur Überprüfung des Konservierungserfolgs wurden sowohl hämodynamische als auch funktionelle Parameter ausgewertet. Des Weiteren erfolgte die histologische Beurteilung mittels Morphometrie der Lungen nach Beendigung der Versuche.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tiere

Zu den Versuchen wurden Hausschweine (*Jus scrofa domestica*) verwendet (Gewicht 25 - 40 kg). Die Pflege und Fütterung der Hausschweine erfolgte im Tierhof der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Die Tierhaltung, die artgerechte Pflege, sowie die Tötungsversuche erfolgten nach den Richtlinien des deutschen Bundesgesetzblattes für Tierhaltung und Tierversuche. Sämtliche Versuche wurden dem Regierungspräsidium Tübingen (Referat 37) gemäß §8a Abs. 1 und 2 ordnungsgemäß angezeigt. Die Tierversuche unterlagen der ständigen Kontrolle der Tierschutzbeauftragten der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

2.1.2. Perfusionslösung

Zur Herstellung der Perfusionslösung wurde frisches Schweineblut vom Schlachthof verwendet.

Unmittelbar nach dem Auffangen in 1,5 l Behältern wurde das Blut mittels 2000 IU Liquemin pro 1,5 l ungerinnbar gemacht und in Kühlboxen gelagert. Um es von seinen Plasmabestandteilen, den weißen Blutzellen sowie den Thrombozyten zu trennen, wurde das Blut anschließend mit einer Zentrifuge (Haemonetics cell saver 4, München, Deutschland) bei 5650 Umdrehungen pro Minute mit 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen. Daraufhin wurde das Blut mit kaliumarmer Krebs-Henseleit-Lösung auf einen Hämatokritwert zwischen 32 % und 38 % diluiert und bei 10 °C gelagert .

2.1.3. Dilutionslösung

Zur Dilution und Einstellung des Spenderblutes auf einen Hämatokritwert von 32 % bis 38 % wurde kaliumarme Krebs-Henseleit-Lösung verwendet.

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung:

| | |
|-----------|--------------------------------------------|
| 7,352 g | Calciumchlorid-2-Hydrat 2,5 mM |
| 105,192 g | Natriumchlorid 90,0 mM |
| 50,406 g | Natriumhydrogencarbonat 30,0 mM |
| 2,840 g | Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1,0 mM |
| 4,930 g | Magnesiumsulfat-7-Hydrat 1,0 mM |
| 21,802 g | Glucose-Monohydrat 5,5 mM |
| 2,422 g | Natrium-Pyruvat 1,1 mM |

Der pH-Wert der Lösung betrug 8,2 bei 20 °C.

Lagerung bei 10 °C.

2.1.4. Konservierungslösungen

Zusammensetzung der Lungenperfusionslösung Perfadex®:

| | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| 50,000 g | Dextran 40000 Dalton Molekulargewicht |
| 8,000 g | Natriumchlorid |
| 0,400 g | Kaliumchlorid |
| 0,098 g | Magnesiumsulfat-Anhydrat |
| 0,046 g | Di-Natriumphosphat-Anhydrat |
| 0,063 g | Monokaliumphosphat |
| 0,910 g | Glucose-Anhydrat |
| ad 1000,0 ml Aqua dest. | |

Der pH- Wert der Lösung betrug 5,0 bei 20 °C.

Lagerung bei 10 °C.

Zusammensetzung der Perfusionslösung Celsior®:

| | |
|-------------------------|------------------------|
| 10,930 g | Mannitol |
| 28,664 g | Laktobionat |
| 2,942 g | Glutamat |
| 4,000 g | Natriumhydroxid |
| 0,037 g | Kalziumchlorid |
| 1,118 g | Kaliumchlorid |
| 2,642 g | Magnesiumchlorid |
| 4,650 g | Histidin |
| 0,921 g | Glutathion (reduziert) |
| ad 1000,0 ml Aqua dest. | |

Der pH- Wert der Lösung betrug 7,3 bei 20 °C.

Lagerung bei 4 °C

2.2. Versuchsprotokoll**2.2.1. Versuchsgruppen**

Zur Durchführung der Versuche wurden 19 Hausschweine verwendet. Ihr Gewicht betrug zwischen 25 und 40 kg. Diese Tiere wurden in 2 Gruppen aufgeteilt.

In der ersten Gruppe, welche aus 9 Tieren bestand, wurden die Lungen mit 2 l Perfadex® konserviert.

In der zweiten Gruppe, bestehend aus 10 Tieren, erfolgte die Konservierung mit 2 l Celsior®.

2.2.2. Anästhesie

Im Tierhof der Universität Tübingen wurde bereits vor Transportbeginn die Prämedikation der Schweine mit Atropin initiiert. Im Tierversuchslabor folgte die Einleitung der Anästhesie mit Azaperon, Flunitrazepam und Ketaminhydrochlorid, sowie eine Inhalationsnarkose mit einem Gemisch aus Lachgas und Sauerstoff, sowie Isoflurangabe nach Bedarf.

(Schema 1)

Schema 1: Narkose

| Prämedikation | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Atropin Atropinsulfat Dobrena [®] | 0,05 mg/kg Körpergewicht |
| Anästhesie | |
| Azaperon Stresnil [®] | 4,0 mg/kg Körpergewicht |
| Flunitrazepam Rohypnol [®] | 0,1 mg/kg Körpergewicht |
| Ketaminhydrochlorid Ketanest 50 [®] | 7,0 mg/kg Körpergewicht |
| Inhalationsnarkose | |
| Lachgas- (3,5 l/min)/Sauerstoff- (2 l/min) Gemisch Isofluran (Forene [®]) nach Bedarf (0,5 % bis 2 %) | |

2.2.3. Präparation und Konservierung

Zur Präparation und Konservierung des Lungenpaketes wurde das Schwein intubiert und mit 8,5 l bei 20 Atemzügen/min beatmet (Siemens-Elema Servoventilator 900, Siemens, Erlangen, Deutschland). Die Luft wurde mit 40%

Sauerstoff angereichert und ein positiver endexpiratorischer Druck von 5 cm Wassersäule eingehalten.

Der Thorax des narkotisierten Tieres wurde durch Sternotomie eröffnet, das Operationsfeld mit einem Thoraxspreizer fixiert, der Thymus abpräpariert und entfernt. Das Perikard wurde mit einem Tupfer vom Thorax mobilisiert. Die Eröffnung des Perikards erfolgte durch eine 2 - 3 cm lange Inzision im Bereich der *Arteria pulmonalis*.

Die Vollheparinisierung des Schweines erfolgte mittels intrakardialer Injektion von 20000 IU Natrium-Heparin.

In die *Arteria pulmonalis* wurde ein *Swan-Ganz*-Katheter zur Messung des pulmonalarteriellen Drucks eingeführt. Nun wurde eine Tabaksbeutelnaht an der *Arteria pulmonalis* vorgelegt, die Arterie für die Kanülierung inzidiert und anschließend die Kanülierung der *Arteria pulmonalis* mit einer 7-F-Kanüle vorgenommen.

Es erfolgte die Perfusion der Lunge mit 2 l gekühlter (10 °C) Konservierungslösung.

Zur Entnahme wurde das Herz-Lungen-Paket an der *Aorta thoracica* und der *Vena cava inferior*, direkt über dem *Diaphragma*, abgesetzt. Nach kranial wurde die *Trachea* freipräpariert und kaudal des *Larynx* abgesetzt.

Die Lunge wurde während und nach der Entnahme wie oben beschrieben beatmet.

Das Herz-Lungen-Paket wurde gewogen, in mittlerer Inspirationstiefe entfaltet und anschließend in eine Organwanne mit 10 °C kalter 0,9 %-iger Kochsalzlösung gelegt.

Nachdem im linken Atrium ein Druckmesskatheter plaziert worden war, welcher zur arteriellen Blutentnahme im folgenden Versuchsablauf diente, erfolgte die Lagerung über 24 Stunden in 0,9 %-iger Kochsalzlösung luftdicht abgedeckt bei 10 °C.



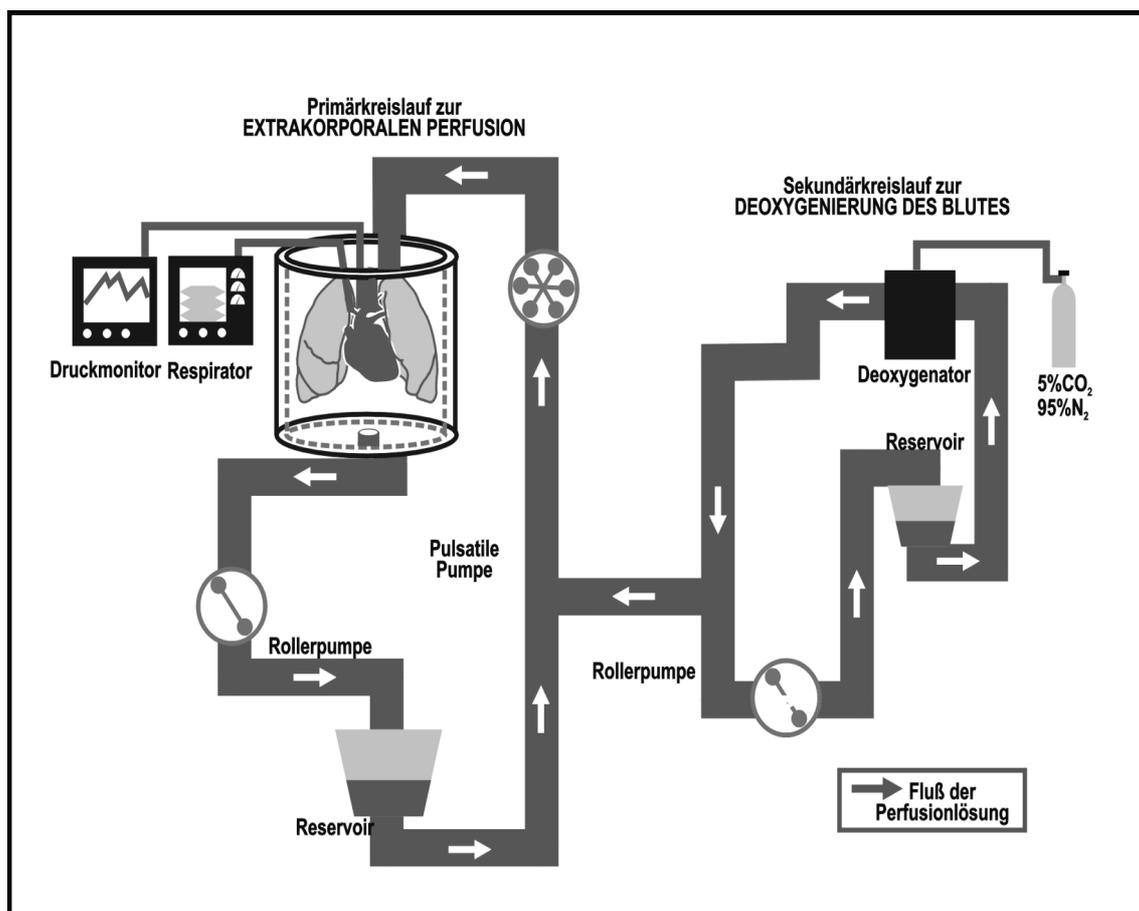
Abb.1: Lunge nach Entnahme

2.2.4. Extrakorporaler Kreislauf

Das Modell des extrakorporalen Kreislaufes bestand aus 2 Circuli:

- 1) Primärkreislauf zur extrakorporalen pulsatilen Lungenperfusion
- 2) Sekundärkreislauf zur Deoxygenierung des Blutes

Schema 2: Schaubild des extrakorporalen Kreislaufes



Aus dem Primärkreislauf wurde oxygeniertes Blut in den Sekundärkreislauf geleitet, in welchem eine Deoxygenierung erfolgte.

Vor den Beobachtungszeitpunkten 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurde jeweils deoxygeniertes Blut aus dem Sekundärkreislauf in den extrakorporalen Primärkreislauf geleitet.

Extrakorporaler Primärkreislauf:

Die Perfusionslösung aus der Organwanne wurde von einer Rollerpumpe (Sarns inc., Ann Arbor, Michigan, USA) in ein beheiztes Reservoir gefördert und von dort über eine pulsatile Pumpe (Stöckert, München, Deutschland) mit 0,3 l/min und einer Pulsfrequenz von 90/min und suffizienter Pulsamplitude über eine Kanüle in der *Arteria pulmonalis* dem Lungenpaket zugeführt.

Aus der Lunge floss das oxygenierte Blut über die *Vena pulmonalis* ins linke *Atrium*, in den linken *Ventrikel* und von dort über einen Schnitt im *Apex Cordis* zurück in die Organwanne.

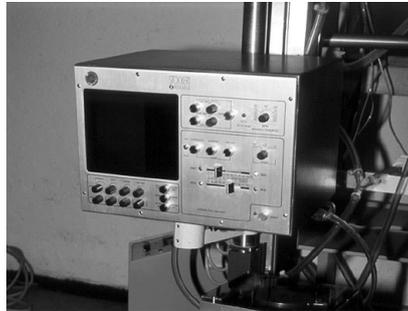


Abb. 2: Detailaufnahme pulsatile Pumpmodul

Sekundärkreislauf:

Dieser Kreislauf bestand aus einem beheizten Reservoir und einer Rollerpumpe (Sarns inc., Ann Arbor, Michigan, USA), durch welche das Perfusat in einen Oxygenator (Baxter Univox TM Membrane Oxygenation System, Irvine, USA) und von dort zurück in das Reservoir gelangte. Der Oxygenator wurde mit einem Fluss von 4 l/min 95 %-igem Stickstoff und 0,5 l/min 5 %-igem Kohlendioxid begast. Er deoxygenierte das sauerstoffreiche Blut aus dem Primärkreislauf. Eine Wärmepumpe (Haake, Berlin, Deutschland) beheizte beide Kreisläufe mit 37 °C warmem Wasser.

2.2.5. Beatmung

Während des Experiments erfolgte die Beatmung der Lungen mit Raumluft durch einen Tierrespirator (Pulmomat 19 K1, Dräger, Bremen, Deutschland).

Das Atemzugvolumen betrug 400 ml bei einer Atemfrequenz von 12/min. Ein positiver endexpiratorischer Druck von 5 cm Wassersäule wurde aufrecht erhalten.

2.2.6. Reperfusion und Datenerhebung

Der extrakorporale Kreislauf wurde mit 3000 ml Perfusionslösung gefüllt und der Herz-Lungen-Block in einem Winkel von 45° in der Organwanne gelagert, um einem Ventilations-Perfusions-Mismatch vorzubeugen.

Zur Reperfusion erfolgte der Anschluss des Lungenpaketes an den Kreislauf über die kanülierte *Arteria pulmonalis*. Der ebenfalls in der *Arteria pulmonalis* liegende *Swan-Ganz*-Katheter wurde zur Druckmessung an den Druckabnehmer und Monitor (Hellige, Freiburg im Breisgau, Deutschland) angeschlossen und der extrakorporale Kreislauf mit einem Teil der Perfusionslösung in kontinuierlichem Fluss von 0,1 l/min angefahren. Der Druckabnehmer wurde geeicht und kalibriert und der Nullpunkt in Höhe der *Arteria pulmonalis* definiert. Nach der Eichung erfolgte die Umstellung des bisher kontinuierlichen Blutflusses auf pulsatilen Fluss und die sukzessive Flussteigerung auf 0,3 l/min.

Währenddessen wurde im Sekundärkreislauf der andere Teil der Perfusionslösung stetig mit 4 l/min 95%-igem Stickstoff und 0,5 l/min 5%-igem Kohlendioxid begast. In Abständen von 10 Minuten wurde der venöse Pool über eine Verbindung zum Primärkreislauf in das zuvor entleerte Reservoir umgeleitet. Somit wurde der Lunge jeweils sauerstoffarmes Blut zugeführt, welches nun von ihr oxygeniert werden konnte.

Während dieser Zeitspanne wurden in 10-minütigen Abständen arterielle Blutproben über den Katheter im linken *Atrium* abgenommen und zeitgleich im

venösen Kreislauf Kontrollproben entnommen. Anschließend wurde der Deoxygenationskreislauf wieder mit dem zuvor arterialisierten Blut aufgefüllt.

Um den extrakorporalen Kreislauf aufrechtzuerhalten benötigte man 3 l Perfusionslösung.

Der experimentelle Zeitraum betrug 60 Minuten.

Im Abstand von 10 Minuten wurde der Sauerstoffpartialdruck sowie die Sauerstoffsättigung in einem Blutgasanalysegerät (NOVA Biomedical, Rödermark, Deutschland) bestimmt.

Der Inspirationsdruck (PIP), sowie der diastolische und systolische pulmonalarterielle Druck (PAP) wurden, ebenfalls in 10-minütigen Abständen, protokolliert. Der mittlere pulmonalarterielle Druck wurde mit Hilfe der Formel $\frac{2}{3} \text{PAP dia} + \frac{1}{3} \text{PAP sys}$ berechnet.

2.2.7. Nass- und Trockengewicht

Nach jedem Experiment wurde ein 1 cm³ großes Stück aus dem Mediastinallappen der Schweinelunge entnommen. Das Lungenstück wurde mit einer Präzisionswaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) gewogen und anschließend in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 50 °C mindestens 48 Stunden getrocknet und nochmals gewogen.

Das Verhältnis Nass- zu Trockengewicht wurde berechnet (W/D ratio).

2.2.8. Malondialdehyd

Zur Bestimmung der Malondialdehydkonzentration im Blut wurde nach 10-, 30- und 50-minütiger Reperfusion je ein EDTA-Röhrchen Blut aus dem linken Atrium entnommen.

Malondialdehyd (MDA) ist ein Parameter für das Ausmaß der Lipidperoxidation an Endothelien und somit ein Indikator für oxidativen Stress während der Ischämiezeit.

Zur Messung wurde ein *Lipid Peroxidation Assay Kit* der Firma Calbiochem verwendet. Mit Hilfe eines chromogenen Agens, welches mit MDA reagiert, entsteht ein stabiler Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 586 nm, welches mit einem Spektrophotometer gemessen worden ist.

2.2.9. Histologie

Die Konservierung der Lungen für die folgende histologische Bearbeitung erfolgte nach Ende des Versuches mit 3%-igem Formaldehyd. Die Fixierung des Organs geschah dabei über eine Kanüle in der *Arteria pulmonalis*.

Zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden Proben aus tiefen und oberflächlichen Anteilen beider Ober- und Unterlappen sowie des Mediastinallappens entnommen. Die Organe wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffinblöcke (Paraplast[®] Plus, Sherwood Medical Company, St.Louis, USA) eingebettet. Es wurden Schnitte in einem Mikrotom (Fa. Jung, Heidelberg, Deutschland) mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Die anschließende Färbung zur histologischen Aufarbeitung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin.

Die morphometrische Auswertung erfolgte an einer Morphometriestation bestehend aus einem Leica-Mikroskop DM RBE (Leica, Bensheim, Deutschland) sowie der Software Quantimed 600 (Leica, Bensheim, Deutschland). Dabei wurde mit einer Gesamtvergrößerung von 400fach an jeweils 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt der Anteil des Parenchyms an der

Gesamtfläche bestimmt. Dieser Parameter wird als Anzahl der von Parenchym bedeckten Pixel auf der Matrix des Monitors wiedergegeben. Es wurde anschließend das Verhältnis des verbliebenen Luftraums zum Parenchymanteil berechnet. Die Gesamtvergrößerung von 400fach wurde gewählt, um ein optimales Verhältnis von Genauigkeit der Bestimmung und der Auswertung einer möglichst großen Gesamtfläche zu erreichen.

Zum Ausgleich eines eventuellen Fehlers durch inhomogene feingewebliche Struktur innerhalb eines Schnittes diente die Auswertung von jeweils 10 Gesichtsfeldern und die Verwendung eines Mittelwertes der jeweils bestimmten Werte.

Die Identifikation des jeweils zu bestimmenden Gewebes erfolgte über eine Graustufenerkennung. Dazu wurde das digitale Bild des jeweils zu messenden Gesichtsfeldes in den Computer der Morphometriestation eingelesen. Die Zielvolumen gehörenden Graustufen wurden über einen Referenzpunkt im Zielgewebe festgelegt. Es konnten dabei 2 verschiedene Referenzpunkte für Luftraum und Parenchym bestimmt werden, die durch Platzierung eines Messpunktes im Alveolarraum und im Gewebe des Organs die jeweilige Graustufe des festgelegten Punktes ermittelten. Gleiche und innerhalb vorher festgelegter Grenzen nach oben und unten abweichende Graustufen wurden nun vom Programm im Gesichtsfeld identifiziert und markiert. Überdetektionen wurden nach automatischer Bestimmung durch die Morphometriestation unter visueller Kontrolle am Bildschirm korrigiert. Dazu konnten Überdetektionen durch eine manuelle Löschung von zuviel bestimmten Arealen ausgeglichen beziehungsweise fehlerhaft nicht detektierte Anteile integriert werden. Auf diese Weise konnte beispielsweise Ödemflüssigkeit und Zellen, die intraalveolär zu finden waren und aufgrund ähnlicher Graustufenwerte als Parenchym detektiert wurden, entfernt werden. Durch diese nachträgliche Kontrolle konnte eine deutlich höhere Bestimmungspräzision erreicht werden.

2.2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Informationsverarbeitung der Universität Tübingen unter Beratung von Herrn Prof. Dr. K. Dietz.

Alle experimentell erhobenen Daten wurden auf Datenträger übertragen und per PC mittels statistischer Software (JMP, Version 3.1, SAS, Heidelberg, Cary, NC, USA) bearbeitet. Mit den post hoc Tests nach der Methode von Tukey-Kramer wurde beim Gruppenvergleich eine Varianzanalyse durchgeführt.

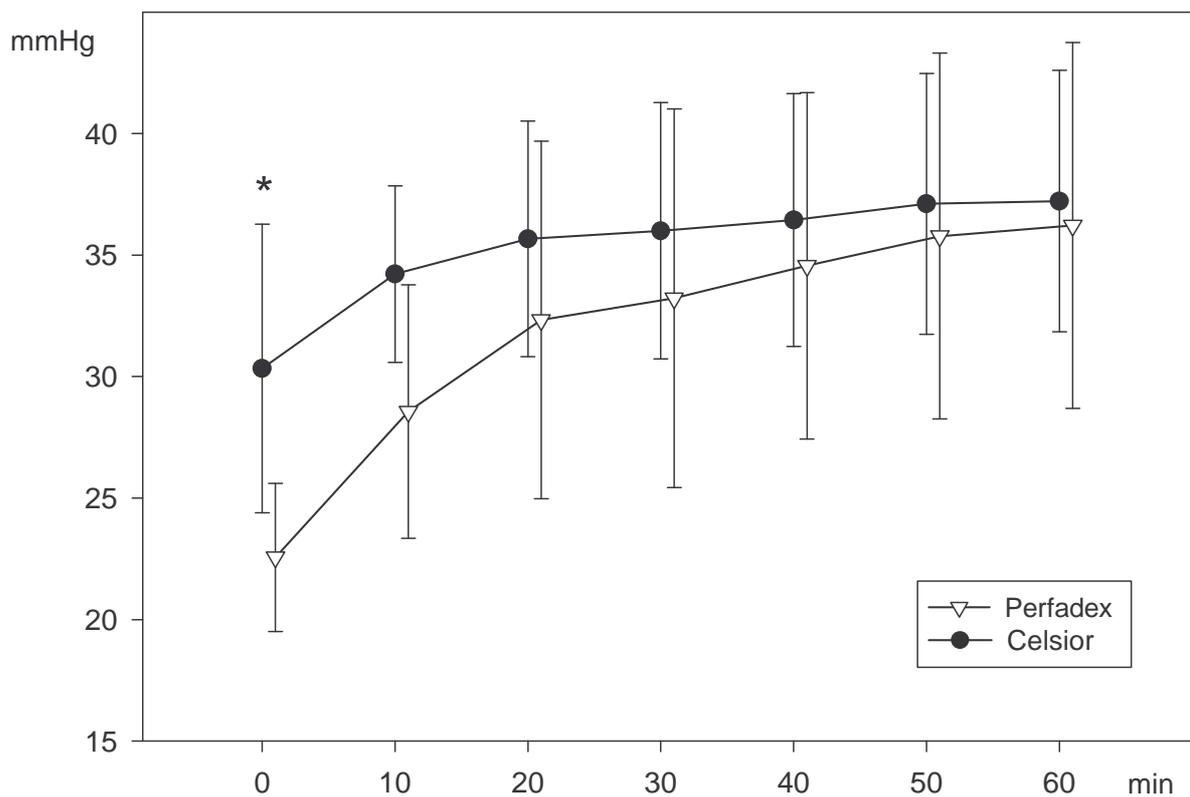
Im Falle der Paarvergleiche wurden für die Differenzen der Mittelwert und dessen 95%-Konfidenzintervall berechnet. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte auf einem zweiseitigen Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Die nachfolgend im Text dargestellten Werte sind, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

3. Ergebnisse

3.1. Pulmonaler Inspirationsdruck (PIP)

Der pulmonale Inspirationsdruck stieg in beiden Gruppen im Verlauf der Reperfusion an. Zu Beginn der Reperfusion zeigte sich dabei ein signifikant erhöhter Wert in der Celsior[®]-Gruppe (0 min: Perfadex[®] $29,1 \pm 6,82$ gegenüber Celsior[®] $22,6 \pm 3,05$, $p=0,04$)(Abb.3).



*= $p < 0,05$ Perfadex[®] versus Celsior[®]

Abb.3: Pulmonaler Inspirationsdruck

3.2. Mittlerer pulmonalarterieller Druck (PAP)

Die Werte des mittleren pulmonalarteriellen Druckes zeigten in der Celsior[®]-Gruppe niedrigere Werte als bei den Versuchen, in denen Perfadex[®] als Konservierungslösung verwendet wurde, ohne jedoch statistische Relevanz zu erreichen. Zu Beginn des Versuches konnte in beiden Fällen ein Anstieg der Drücke verzeichnet werden, wohingegen der PAP gegen Ende der Messungen wieder abfiel (Abb. 4).

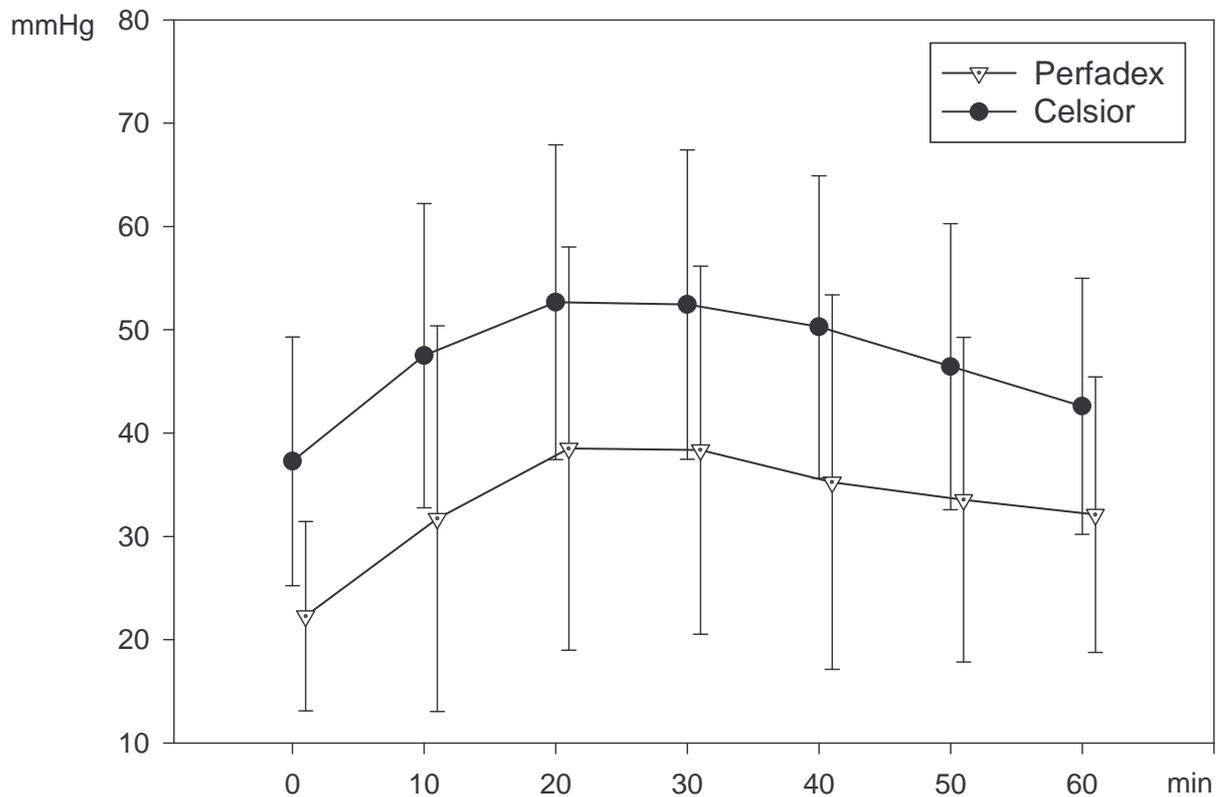
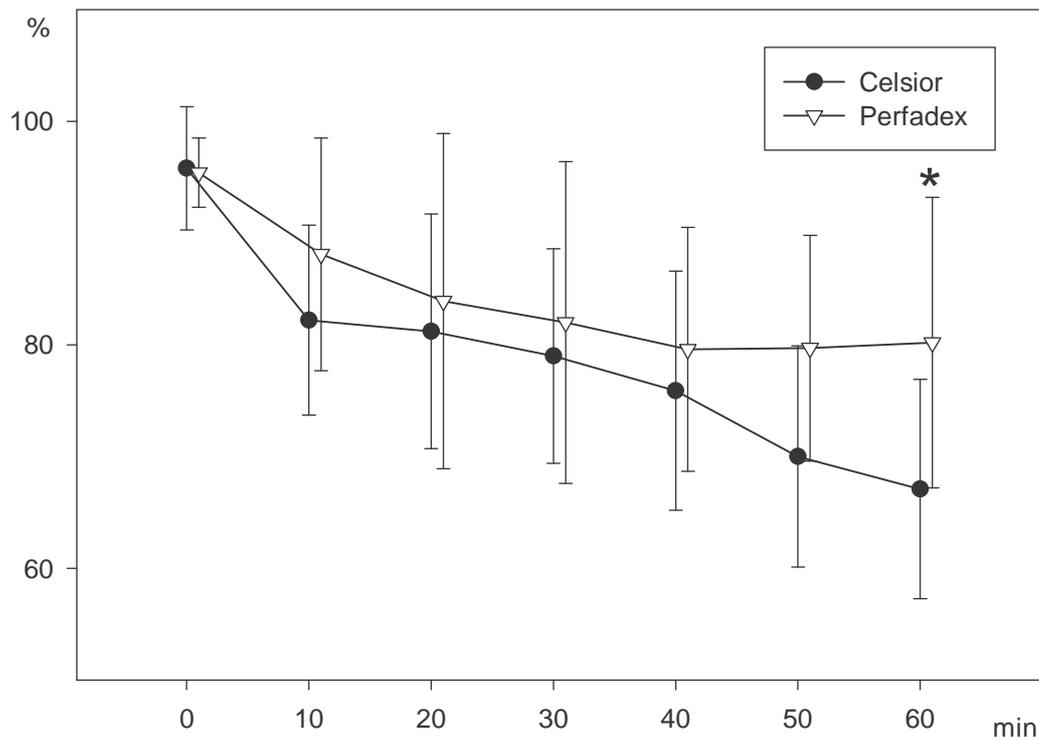


Abb.4: Mittlerer pulmonalarterieller Druck in mmHg

3.3. Arterielle Sauerstoffsättigung (saO₂)

In beiden Versuchsgruppen fiel die Sauerstoffsättigung in der ersten Stunde nach Reperfusion der Lunge ab. Während sie jedoch in der Perfadex[®]-Gruppe nach 40 Minuten ein Plateau bei ca. 80 % erreichte, fielen die Werte in der Celsior[®]-Gruppe weiter ab. Nach 60 Minuten resultierte eine signifikante Abweichung zugunsten der mit Perfadex[®] konservierten Organe (60 min: Celsior[®] 67,09 ± 9,77 gegenüber Perfadex[®] 80,19 ± 12,97, p = 0,02) (Abb. 5).

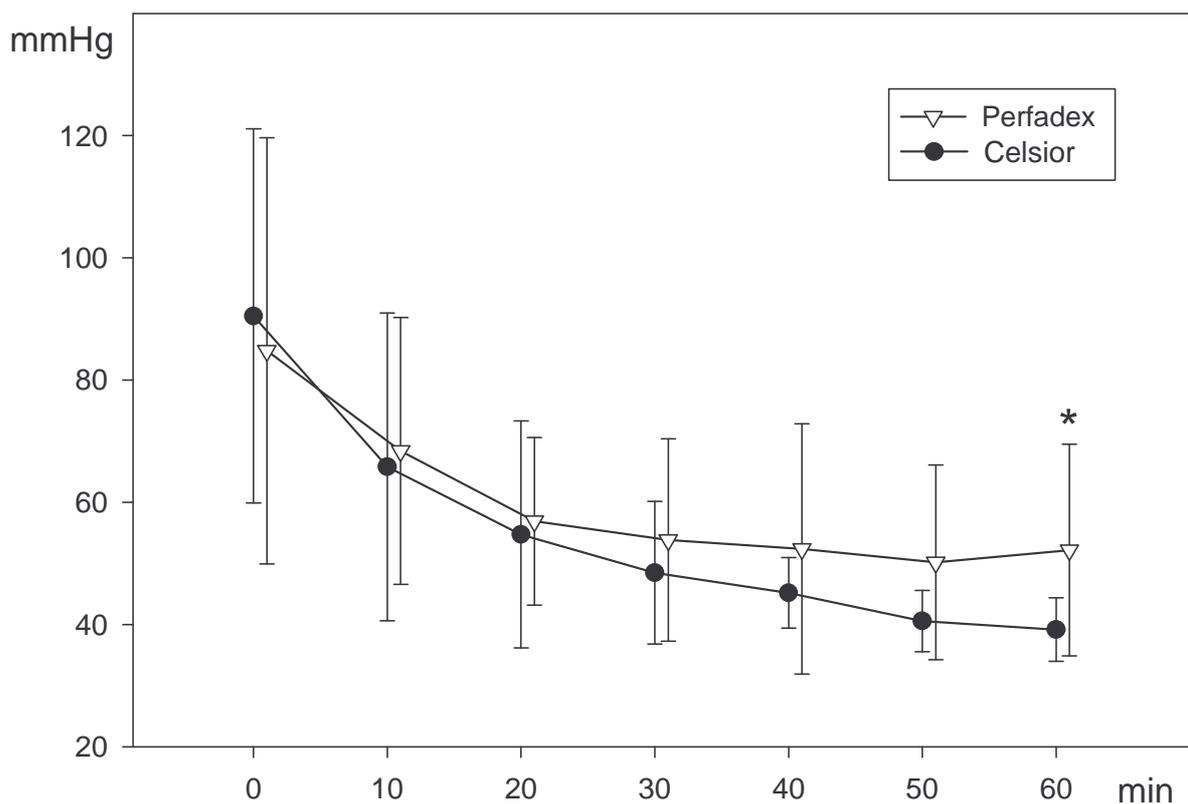


*=p<0,05 Perfadex[®] versus Celsior[®]

Abb.5: Arterielle Sauerstoffsättigung in %

3.4. Arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO₂)

Beim arteriellen Sauerstoffpartialdruck war der Anfangswert nach Wiederperfusion der konservierten Lungen in der Celsior[®]-Gruppe höher als in der Perfadex[®]-Gruppe, ohne jedoch statistische Relevanz zu erreichen. Im weiteren Verlauf der Reperfusion zeigten sich jedoch im Vergleich der beiden Gruppen konstant höhere Werte in der Perfadex[®]-Gruppe. Nach 60 min. war dieser Unterschied signifikant (60 min: Celsior[®] 38,76 ± 5,10 gegenüber Perfadex[®] 52,18 ± 17,33, p=0,03) (Abb. 6).



*=p<0,05 Perfadex[®] versus Celsior[®]

Abb.6: Arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg

3.5. Malondialdehyd

Die Bildung von Malondialdehyd war in der Celsior[®]-Gruppe deutlich geringer ausgeprägt als in der Perfadex[®]-Gruppe. Die Differenzen waren nach 30 Minuten und nach 50 Minuten signifikant (30 min: Celsior[®] $4,07 \pm 1,53$ gegenüber Perfadex[®] $6,73 \pm 1,42$, $p = 0,007$, 50 min: Celsior[®] $5,18 \pm 1,86$ gegenüber Perfadex[®] $7,35 \pm 1,60$, $p = 0,02$) (Abb.7).

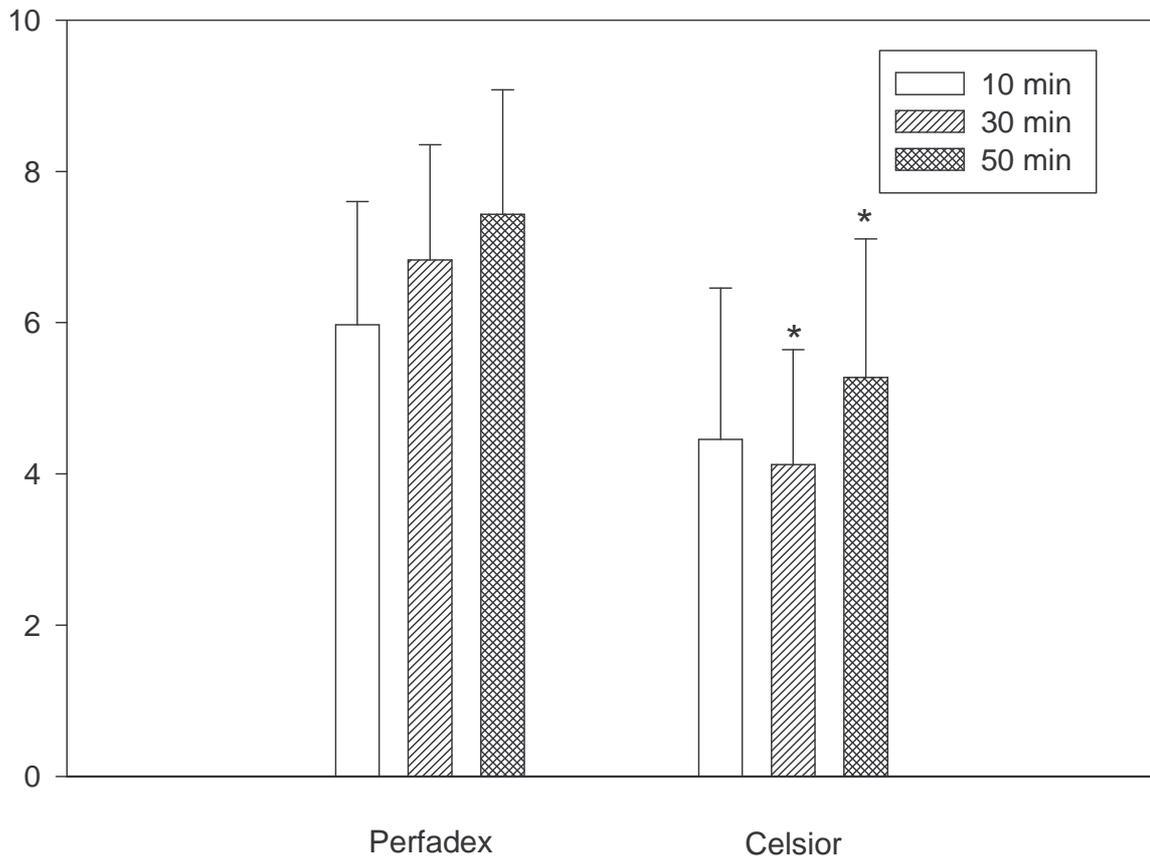


Abb. 7: Malondialdehyd in µM

3.6. Morphometrie

3.6.1. Parenchymanteil

Bei der Auswertung der morphometrisch ermittelten Daten ergab sich in der Perfadex[®]-Gruppe eine signifikant höhere Menge an Parenchym gegenüber den mit Celsior[®] konservierten Organen (Perfadex[®]: $2,40 \times 10^5 \pm 0,48 \times 10^5$ Pixel, Celsior[®] $1,91 \times 10^5 \pm 0,25 \times 10^5$, $p = 0,02$, Abb. 8).

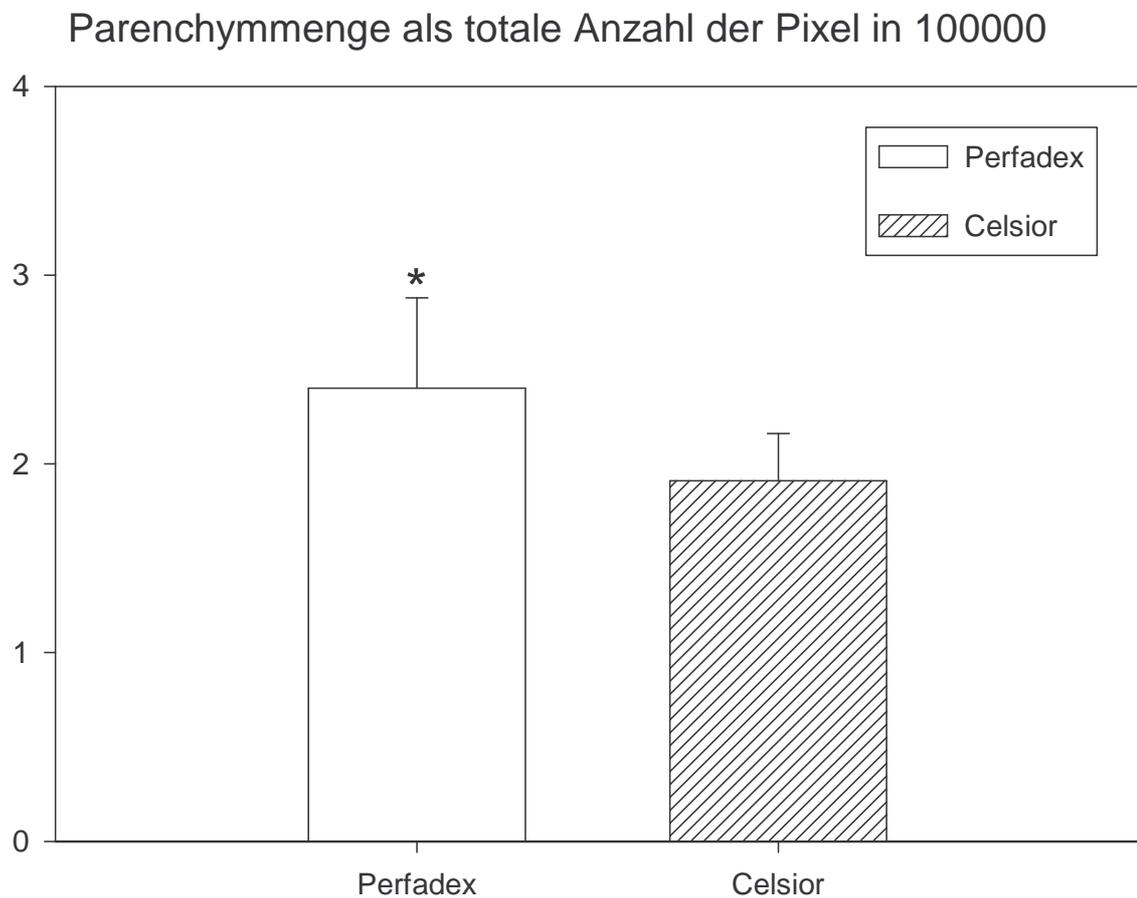


Abb.8: Parenchymmenge als totale Anzahl der gemessenen Pixel in 100000

3.6.2 Anteil des Luftraums

Bei der Bestimmung des in einem Gesichtsfeld befindlichen luftgefüllten Raumes ergab sich ein signifikant erhöhter alveolärer Luftanteil in den mit Celsior® konservierten Lungen im Vergleich zur Perfadex®-Gruppe (Perfadex®: 271% ± 43% des Parenchymanteils, Celsior®: 362% ± 70%, $p = 0,01$, siehe Abb.9).

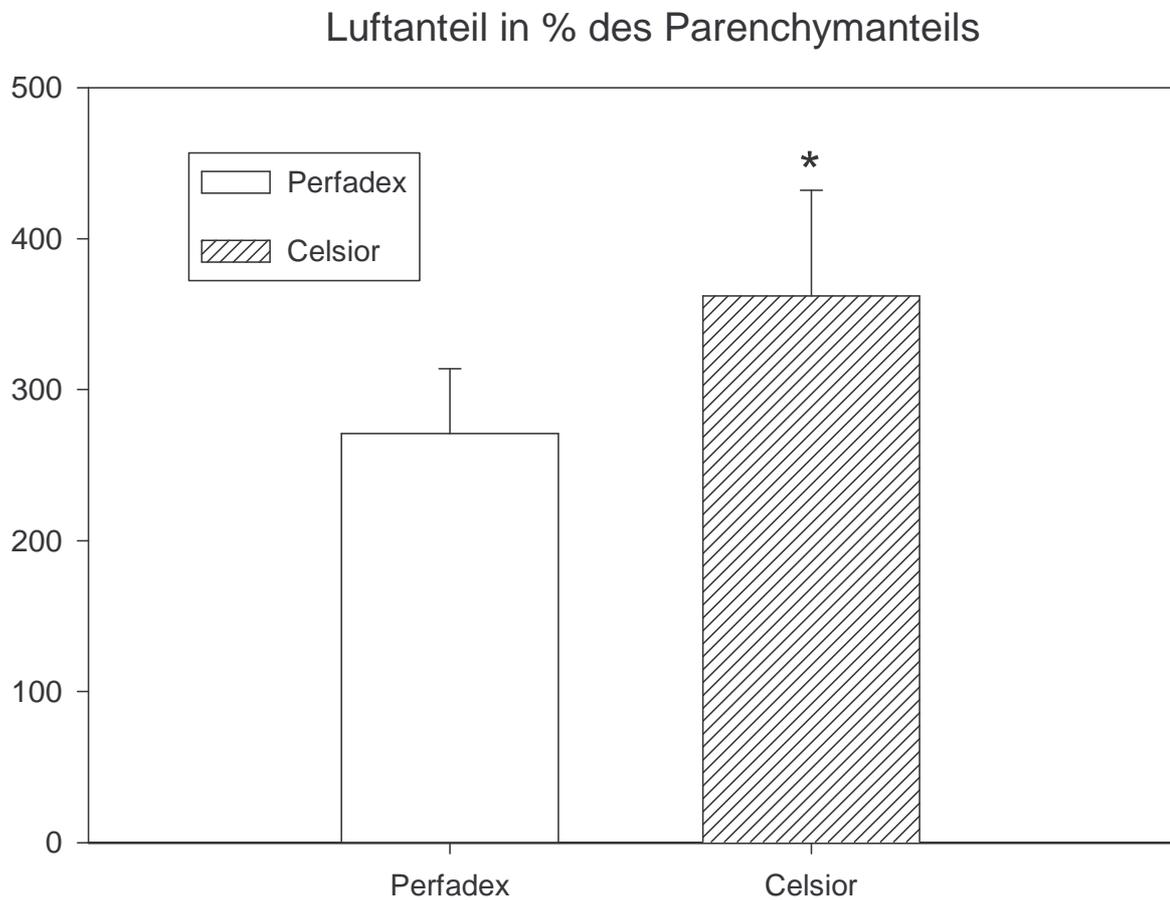


Abb. 9: Luftraum in % des Parenchymanteils

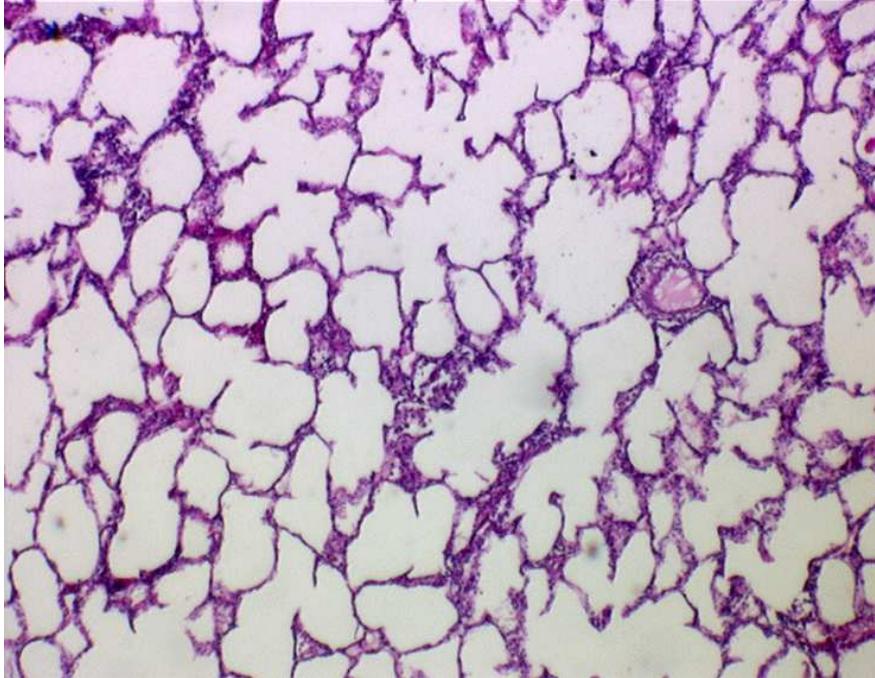


Abb. 10: Übersichtsaufnahme eines Schnittes mit Celsior® konservierter Lunge, Vergrößerung 400fach

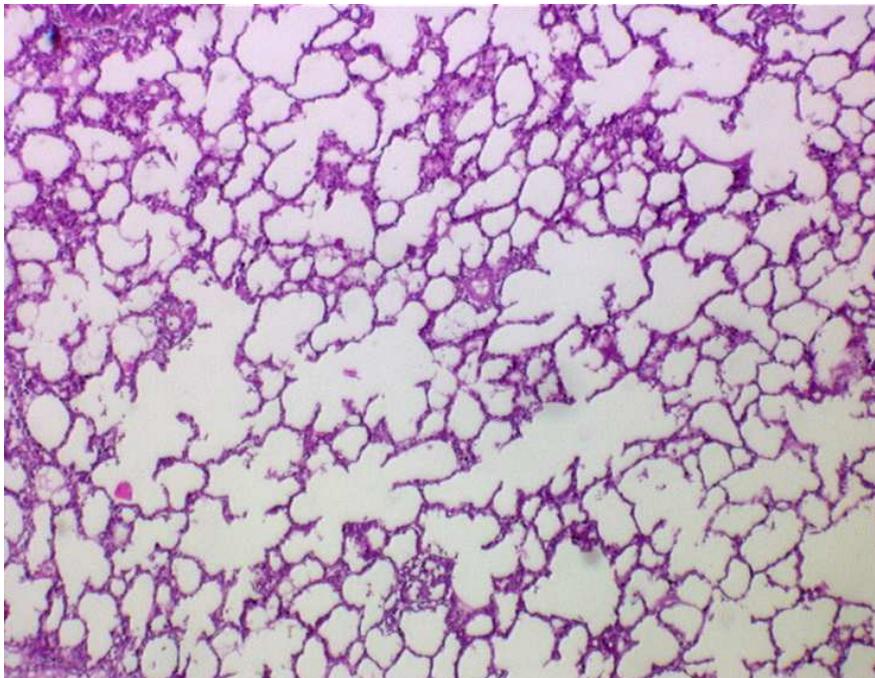


Abb. 11: Übersichtsaufnahme eines Schnittes mit Perfadex® konservierter Lunge, Vergrößerung 400fach

3.7. Nass/Trockengewichtsquotient (W/D - Ratio)

Die W/D-Ratio der Celsior[®]-Gruppe war gegenüber der Perfadex[®]-Gruppe erhöht. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb.12).

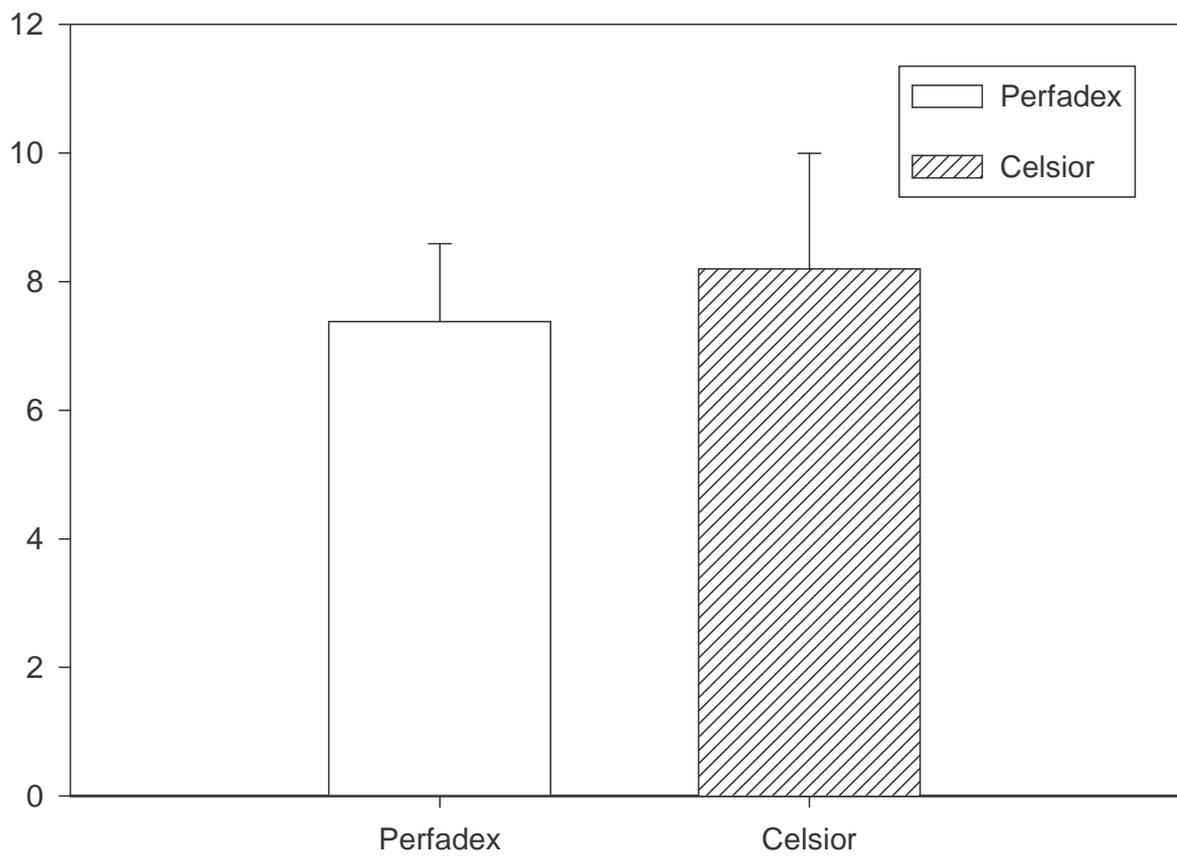


Abb.12: Nass/Trockengewichtsquotient

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Fragestellung

Von Steen konnte bereits 1993 die Leistungsfähigkeit von Perfadex[®] als Konservierungslösung in der Lungentransplantationschirurgie gezeigt werden. Es ergaben sich noch nach einer Ischämiezeit von 24 Stunden hervorragende Ergebnisse mit Sauerstoffpartialdrücken von 188 mmHg. Der pulmonalarterielle Druck war mit 30 mmHg nur leicht erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (87). Da wünschenswert ist, mit einer einzigen Lösung bei der Organexplantation eine bestmögliche Erhaltung aller Organe zu erreichen, ist ein Vergleich von Perfadex[®] mit der in der Herztransplantation etablierten Lösung Celsior[®] bei der Präservierung der Lunge ein wichtiger Punkt. Es muss geklärt werden, ob die Verwendung einer der beiden Lösungen eine gute Konservierung beider Organsysteme ermöglicht.

4.1. Diskussion des Modells

Die Entscheidung, die Versuche in einem Grosstiermodell durchzuführen, erfolgte aufgrund der Tatsache, dass bereits eine Reihe von Studien unter Verwendung von Celsior[®] als neu geprüfter Lungen-Konservierungslösung existieren, diese aber stets als Kleinterversuche mit der Ratte als Versuchstier durchgeführt worden waren (8,14,24,25,78,83,97,99). Diese Vorgehensweise ist als Screening-Modell sicherlich geeignet. Die Übertragbarkeit auf mögliche Ergebnisse bei der Anwendung am Menschen muss jedoch in Frage gestellt werden. Die zum gegenwärtigen Zeitpunkt einzige Großtierstudie, bei der die Organe mit Celsior[®] perfundiert wurden, befasste sich mit der Konservierung von Nieren (5).

Für die Verwendung von Schweinen als Versuchstiere spricht im Fall eines Grosstierversuches die relative Ähnlichkeit der Organstrukturen mit denen des

Menschen und die damit verbundene gute Übertragbarkeit der Ergebnisse. Generell besteht jedoch in der Fachwelt kein Konsens darüber, welches Tier in einem solchen Fall am besten zu verwenden ist (54).

Die Perfusion der Lunge mit der Konservierungslösung erfolgte mit bereits auf 10 °C vorgekühlter Lösung im Falle von Perfadex[®], beziehungsweise 4 °C im Falle von Celsior[®]. Die tiefere Temperatur im zweiten Fall wurde gewählt, um den offiziellen Anwendungshinweisen der Firma Pasteur Merieux korrekt nachzukommen. Inzwischen stellte sich jedoch heraus, dass durch die Verwendung von 15 °C warmer Celsior[®]-Lösung die Funktion der Lunge weiter verbessert werden kann (98).

In unserem Modell wurden die Organe bei der Perfusion mit der Konservierungslösung antegrad perfundiert. Dabei wird das Organpaket via *Arteria pulmonalis* perfundiert, der Abfluss erfolgt über den linken Vorhof. Diese Perfusionstechnik wird auch bei der klinischen Transplantation verwendet. Es existiert jedoch auch die Meinung, eine retrograde Perfusion könnte eine Verbesserung bringen (15,16). Als Grund wird angeführt, dass durch die retrograde Perfusion auch die bronchialen Blutgefäße konserviert werden, was zu einer verbesserten Heilung der bronchialen Anastomosen führt. Bei unserem extrakorporalen Modell kann dieser Faktor allerdings vernachlässigt werden. Auch wird behauptet, dass die Verteilung der Konservierungslösung im retrograden Verfahren gleichmäßiger ist (16).

Das am häufigsten verwendete Modell bei der Untersuchung der Funktion konservierter Lungen besteht heute in einer Allotransplantation einer Einzellunge von einem Spendertier in ein Empfängertier (39,67). Ein entscheidender Nachteil dieses Verfahrens besteht allerdings darin, dass es schwierig ist, postoperativ sowohl physiologische Verhältnisse als auch aussagekräftige Messwerte zu erhalten. Bleibt der Blutfluss durch die nicht transplantierte Lunge erhalten, ist es schwer zu beurteilen, inwieweit eventuell erhaltene gute Oxygenierungswerte auf dieses Organ zurückzuführen sind.

Häufig wird daher dieser Blutfluss durch eine Ligatur der betreffenden *Arteria pulmonalis* unterdrückt beziehungsweise eine kontralaterale Pneumonektomie durchgeführt (39). Dabei besteht jedoch das Problem, dass der komplette Auswurf des rechten Ventrikels durch eine Lunge gepresst und das Gefäßbett dieser Lunge unphysiologisch belastet wird. Umgangen werden könnten diese Probleme durch eine Doppel-Lungentransplantation oder eine kombinierte Herz-Lungentransplantation (54). Diese ist allerdings technisch schwierig durchzuführen. Außerdem ist es durch die zusätzliche Transplantation des Herzens wiederum schwierig, die Funktion der Lungen allein zu bewerten (39,67). Wir haben daher mit der Verwendung eines Herz-Lungen-Blockes in einer extrakorporalen Anordnung eine Methode verwendet, mit der wir hofften, sowohl ein technisch machbares als auch in seiner Aussage valides Verfahren gefunden zu haben. Ein Problem dieser Anordnung ist, dass isoliert reperfundierte Lungen stärker dazu neigen, einen pulmonalen Hochdruck und ein Lungenödem zu entwickeln (67).

Für die Reperfusion wurden von uns gewaschene Schweineerythrozyten verwendet, die in Krebs-Henseleit-Lösung dilutiert wurden. Im Vergleich zur reinen Verwendung einer Krebs-Henseleit-Lösung, in der die Gase physikalisch gelöst sind, stellt dies einen physiologischeren Ansatz dar. Der Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid kann dabei wieder über die Erythrozyten erfolgen. Außerdem enthalten Erythrozyten Antioxidantien und verfügen über eine deutliche Pufferkapazität.

Die Reperfusion erfolgte über eine Rollerpumpe im pulsatilen Modus. Dies stellt wiederum ein physiologischeres Verfahren dar als die kontinuierliche Perfusion, von der bekannt ist, dass sie zu einem verstärkten Ödem führt (39).

Es bleibt zu diskutieren, ob das Hängen des Organblocks im 45°-Winkel in einer Wanne während des Versuchsablaufes einen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Möglicherweise wurden durch das Aufliegen des Organs kleine Blutgefäße oder Bronchien komprimiert oder abgeknickt, was zu überhöhten Werten beim

pulmonalarteriellen Druck oder beim Inspirationsdruck führen könnte. Der Vergleich der Gruppen ist jedoch trotzdem gerechtfertigt, da der Fehler, wenn er denn bestehen sollte, bei jedem verwendeten Organ vorhanden wäre.

Die Messungen wurden nach einer Stunde abgebrochen, da frühere Versuche gezeigt hatten, dass die Hauptschädigung des Organs beim Ischämie/Reperfusionsschaden innerhalb der ersten 15 Minuten stattfindet (13).

Um im Hinblick auf angestrebte längere Ischämiezeiten bei der Transplantation einer Lunge aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde die Lagerungszeit des Organs mit 24 Stunden lange angesetzt. Die Lagerung erfolgte dabei in 10 °C kalter Luft. Diese Temperatur stellte sich in verschiedenen Studien als die am besten geeignete heraus (90,94). Außerdem wurde die Lunge vor der Einlagerung mit Raumluft beatmet und in mittlerer Inspirationsstellung belassen. Auch von diesem Vorgehen wurde gezeigt, dass sich damit gegenüber während der Ischämie kollabierten Lungen bessere Ergebnisse erzielen lassen (20,92). Das optimale Volumen beträgt dabei 50% der totalen Lungenkapazität (20). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Ventilation mit höherer Sauerstoffkonzentration als in Raumluft eher deletäre Wirkung hat (39,67).

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde sowohl die Funktion als auch die strukturelle Beschaffenheit des Organs bewertet. So bietet die Messung der Gasaustauschfähigkeit als wichtigster Funktion der Lunge eine bedeutende Aussage über die Qualität der Konservierung des Organs. Auch die nach Ende des Versuchs durchgeführte Bestimmung des Nass/Trockengewichtsquotienten zur Quantifizierung des Ödems und die Durchführung einer lichtmikroskopischen Bewertung der Präservierung der Struktur der Lunge sind als Standardmethoden bei der Auswertung eines experimentellen Lungentransplantationsversuches anerkannt.

Bei der histologischen Auswertung ist auffallend, dass optisch hervorragend erhaltene Areale in direkter Nachbarschaft zu weniger gut konservierten

Anteilen der Organe zu finden sind. Die Schwierigkeiten, die sich daraus ergeben, sind bereits seit längerem bekannt (25,54).

Um den entstehenden Fehler möglichst klein zu halten und die Ergebnisse so gut reproduzierbar wie nur möglich zu machen wurde mit der Morphometrie eine Methode angewandt, die deutlich präziser arbeitet als das sonst oft verwandte Grading von Ödem oder Gewebsvermehrung in 4 Stufen.

Dabei erfolgt eine objektive Quantifizierung der Flächen im Gesichtsfeld, die beispielsweise verbliebenen Luftraum oder Ödemflüssigkeit in den Alveolen repräsentieren. Die dadurch erhaltenen Werte sind nicht mehr vom subjektiven Eindruck des Auswertenden abhängig. Die Identifikation des interessierenden Gewebes über Graustufen wurde bereits 1987 von MARCHEVSKY *et al.* als valides Verfahren zur Flächenmessung beschrieben (58). Auch von FEHRENBACH *et al.* wird die Morphometrie als zuverlässige Methode etwa zur Bestimmung des Ausmaßes von Ödemansammlungen gesehen (25).

Durch die Vermessung von 10 willkürlich ausgewählten Gesichtsfeldern sowie durch Ausmessung von Gewebeproben aus verschiedenen Teilen der zur Verfügung stehenden Organe kann die durch die Heterogenität der Fixierung entstehende Schwankung drastisch reduziert werden. Die Verwendung von 5 µm dicken HE-gefärbten Schnitten stellt dabei ein Routineverfahren in der Herstellung von Gewebeschnitten dar und wird auch von anderen Autoren zur morphometrischen Auswertung angewendet (95).

Die Bestimmung des Malondialdehyd stellt heutzutage einen preiswert und verlässlich zu messenden Parameter für Lipidperoxidation und damit den oxidativen Stress dar und eignet sich daher besonders gut, um die Effekte der in Celsior[®] enthaltenen Antioxidantien zu überprüfen. Mit dem *Lipid Peroxidation Assay Kit* von Calbiochem steht dabei ein kommerziell erhältliches System zur Verfügung, das spezifisch MDA nachweist. Durch die einfache Anwendung können zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Der inspiratorische Spitzendruck als Marker für die *Compliance* der beatmeten Lunge stieg in beiden Versuchsgruppen im Verlauf der Reperfusion deutlich an. Der Ausgangswert der Celsior[®]-Gruppe lag dabei über dem der Perfadex[®]-Gruppe, hier liegt eine statistisch aussagekräftige Differenz vor. Eine weitere statistische Signifikanz war jedoch nicht zu verzeichnen. Die Gründe für die verminderte *Compliance* sind in Rahmen der kurzen Versuchsphase von einer Stunde am ehesten in der Ausbildung des intraalveolären und interstitiellen Ödems zu suchen. Längerdauernde Umbauvorgänge wie zunehmende Fibrosierung der Organs können ausgeschlossen werden.

Zu Beginn der Reperfusionsphase konnte in allen Versuchen ungeachtet der verwendeten Konservierungslösung ein deutlicher Anstieg der mittleren pulmonalarteriellen Drücke verzeichnet werden. Bei der Auswertung der im weiteren Verlauf der Reperfusion des Organpaketes aufgezeichneten Drücke wurden in der Gruppe, in der Celsior[®] als Konservierungslösung verwendet wurde, geringere Werte registriert als bei den mit Perfadex[®] konservierten Lungen. Gegen Ende der Aufzeichnungsperiode von einer Stunde fielen die PAP-Werte wieder ab.

Der Druck in der Pulmonalarterie hängt, wie der Druck in jedem arteriellen Gefäß des Körpers, von mehreren Faktoren ab.

Dabei spielt beispielsweise der Füllungszustand des Gefäßes, der von der Zufuhr und der Schlagkraft des Herzens abhängt, eine Rolle. Dieser Faktor kann jedoch in unseren Versuchen vernachlässigt werden, da über die pulsatile Rollerpumpe eine konstante Perfusion gewährleistet war.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der Kontraktionszustand des Gefäßes. Dieser ist abhängig von der Kaliumkonzentration der Konservierungslösung. Eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration führt zu einer Depolarisation der Zellmembran der glatten Muskulatur und zu deren Kontraktion. Mit steigender

Konzentration dieses Elektrolytes steigt bei sonst gleichen Bedingungen der Widerstand des Lungenkreislaufes an und der Druck in der Pulmonalarterie nimmt zu. 1991 wurde von KIMBLAD gezeigt, dass durch einen hohen Kaliumgehalt in der Konservierungslösung ein Spasmus der Pulmonalgefäße ausgelöst wird (53). Dieser ist aus mehreren Gründen unerwünscht. Erstens sorgt er für eine inhomogene Präservierung des Organs, die aus einer ungleichen Verteilung der Konservierungslösung in der initialen Perfusion resultiert. Dadurch wird die Lunge ungenügend gekühlt und schädliche Blutbestandteile werden nicht ausreichend entfernt. Zweitens könnten die initial hohen Reperfusionen zu einer Zerstörung endothelialer Zellen führen, dessen Folgen noch genauer beschrieben werden (77).

Sowohl Celsior[®] als auch Perfadex[®] gehören jedoch zu den sogenannten Niederkalium-Konservierungslösungen, so dass auch dies hier im Vergleich keine Rolle spielen sollte.

Ein dritter entscheidender Punkt ist die Schädigung des Gefäßendothels, das mit der Produktion von verschiedenen Mediatoren den Druck im arteriellen Kreislauf bedeutend beeinflusst. Der Kontraktionszustand der glatten Muskulatur in einem Blutgefäß beruht auf dem Verhältnis vasodilatierender und kontrahierender Faktoren. Als erweiternde Einflüsse werden Prostacyclin, Stickoxid (NO) und Adenosin von den Zellen des Endothels freigesetzt (30,66). Diese Stoffe führen neben jener Hauptwirkung noch zu einer Verminderung der Aggregation der Blutplättchen sowie der Haftung der Leukozyten an der Gefäßwand und damit zu einer Verminderung der Produktion freier Radikale. Als konstringierende Moleküle gelten heutzutage hauptsächlich Endothelin, aber auch der *Platelet Activating Factor* (PAF) sowie Thromboxane und Leukotriene als Arachidonsäure-Metaboliten werden im Endothel produziert. Durch diese wird außer der starken Vasokonstriktion noch eine gesteigerte Aggregation von Thrombozyten und eine vermehrte Extravasation von neutrophilen Granulozyten und dadurch im Endeffekt eine vermehrte Produktion freier Sauerstoffradikale moduliert (30,66), die zu weiteren Schädigungen führt.

Eine mögliche Erklärung für den niedrigeren pulmonalarteriellen Druck ist, dass bei der Verwendung von Celsior[®] die Schädigung des Endothels geringer ist als bei Verwendung von Perfadex[®]. Der Grund ist in dem Zusatz von Glutathion als Radikalfänger zu suchen. Es gilt als erwiesen, dass zum Beispiel Superoxid-Radikale, die während der Reperfusion von neutrophilen Granulozyten produziert und freigesetzt werden, zu einer vermehrten Inaktivierung von NO führen und damit eine Vasokonstriktion verursacht wird (66). Hierzu sind allerdings noch weiterführende Experimente notwendig.

Als sensibelster und aussagekräftigster Parameter zur Beurteilung des Erfolgs der Konservierung einer Lunge ist jedoch, auch im klinischen Setting, nach wie vor die Beurteilung der Oxygenierungsfähigkeit des Organs. Diese wurde in unseren Versuchen anhand der arteriellen Sauerstoffsättigung und des pO_2 überprüft. Hierbei zeigte sich zu Beginn der experimentellen Reperfusion, dass in beiden Versuchsgruppen die arterielle Sauerstoffsättigung (saO_2) im Verlauf leicht abfiel. Bei der Konservierung mit Celsior[®] setzte sich dieser Trend bis zum letzten Messpunkt nach 60 Minuten fort, während in der Perfadex[®]-Gruppe nach 40 Minuten ein Plateau erreicht war, welches auch am Ende nicht mehr unterschritten wurde. So ergab sich nach 1 Stunde ein signifikanter Vorteil der mit Perfadex[®] initial perfundierten Organe. Dies ist mit einer besseren Konservierung der Funktion der Lunge gleichzusetzen. Die mit Perfadex[®] konservierten Organe erhalten dabei nach anfänglicher Abnahme der Oxygenierung ein gleichbleibendes Niveau, wohingegen die Funktion der mit Celsior[®] perfundierten Lungen kontinuierlich abnimmt.

Betrachtet man die Fähigkeit der Lunge, den angebotenen Sauerstoff aus dem Blut aufzunehmen anhand des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (pO_2), so ergibt sich am Ende der Messzeit ein Unterschied zwischen beiden Gruppen, der Signifikanzniveau erreicht. In beiden Fällen sinkt der pO_2 im Laufe des Versuchs ab. Ab einer Reperfusionszeit von 10 Minuten bis zum Versuchsende zeigen sich jedoch die mit Perfadex[®] konservierten Organe auch hier überlegen, bis sich am Ende der Reperfusionszeit von einer Stunde in dieser Gruppe ein

signifikant erhöhter Sauerstoffpartialdruck gegenüber mit Celsior[®] perfundierten Organen ergibt. Nach Auswertung beider die klinische Funktion der Lungen betreffenden Parameter ist daher ein signifikanter Vorteil in der Perfadex[®]-Gruppe zu verzeichnen.

Die Gründe für die Ausbildung der mangelnden Atmungsfunktion mit Abfall der arteriellen Sauerstoffsättigung in beiden Gruppen sind vielfältig und nach neuem Kenntnisstand zum Teil auf den Einfluss der freien Sauerstoffradikale zurückzuführen. Es werden dabei sowohl die Pneumozyten, welche die Alveolen auskleiden, als auch die Endothelien der Blutgefäße, vor allem im Bereich der Mikrozirkulation, geschädigt.

Die Alveolen werden von zwei verschiedenen Zelltypen ausgekleidet, Typ I- und Typ II-Pneumozyten. Typ I-Pneumozyten machen etwa 75% der Zellen der respiratorischen Endstrecke aus und bekleiden einen Grossteil von deren Oberfläche. Diese Zellen werden bereits früh geschädigt. Es kommt schließlich zu einer Verdickung der alveolo-kapillären Membran und deren Bedeckung mit hyalinen Membranen (21). Eine ähnliche Pathophysiologie ist beim *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) bekannt.

Typ II-Pneumozyten sind seltener anzutreffen als Typ I-Pneumozyten. Ihre Funktion ist jedoch nicht minder wichtig. Die Aufgabe dieser Zellen ist die Sekretion des *Surfactant*. *Surfactant* senkt die Oberflächenspannung herab und ermöglicht den Alveolen, ihre räumliche Struktur aufrechtzuerhalten. Ohne *Surfactant* wäre die Retraktionskraft der einzelnen Alveolen zu groß, sie würden in sich zusammenfallen, eine Atelektase wäre die Folge. Genau das wurde auch als Folge der Toxizität freier Radikale in Lungen beobachtet (21). Es konnte gezeigt werden, dass nach Ischämie und Reperfusion einer Lunge die Zusammensetzung des *Surfactant* in Richtung eines minderwertigeren Sekretes verändert war (66). Dies spricht für eine Funktionsstörung der Typ II-Pneumozyten als Folge der *reperfusion injury*.

Ein weiterer Faktor, der zu einer Verminderung der Leistungsfähigkeit eines Organs führen kann, ist eine Störung der Mikrozirkulation, im Falle einer Ischämieperiode mit anschließender Reperfusion auch als *no-reflow*-Phänomen bezeichnet. Der Mechanismus dieser Erscheinung ist nicht vollständig geklärt. Mikroskopisch konnte eine Geldrollenbildung großer Mengen roter Blutkörperchen in den Kapillaren gezeigt werden. Auch die Ausbildung eines zellulären Ödems mit nachfolgender Kompression der kleinsten Gefäße könnte eine Rolle spielen (30).

Allerdings gibt es auch andere Veränderungen an den kleinsten Gefäßen, die bei der Transplantation einer Lunge zur Pathophysiologie beitragen. Von ALLISON wurde 1990 gezeigt, dass durch das Setting einer Ischämie des Organs mit nachfolgender Reperfusion die Permeabilität der pulmonalen Gefäße deutlich anstieg (3). Ein interstitielles oder alveoläres Ödem muss die Folge sein (21). Bereits 1983 war dieser Effekt von PARKS et al. als Reaktion auf freie Sauerstoffradikale beobachtet worden (70). Der exakte Mechanismus, wie dieser Zustand erreicht wurde, war jedoch letztlich nicht exakt zu klären. Bereits damals wurde jedoch eine vermehrte Extravasation von Granulozyten beobachtet und von diesen ausgeschüttete Entzündungsmediatoren als Auslöser der erhöhten Durchlässigkeit des Kapillarbettes angeschuldigt (70).

Die Beobachtung einer vermehrten Ansammlung von Entzündungszellen in der Lunge als Reaktion einer Schädigung durch freie Radikale wurde auch von VALLYATHAN und SHI beobachtet. Sie stellten fest, dass diese Moleküle chemotaktische Eigenschaften besitzen, durch die verschiedene Zellen, welche im Entzündungsprozess eine Rolle spielen, in das Interstitium und die Alveolen verlagert zu werden (91). Als Folge dieses Prozesses werden eine Reihe weiterer Zytokine ausgeschüttet, die eine Verstärkung der Inflammation und der Gewebsschädigung zur Folge haben, beispielsweise proteolytische Enzyme, Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen. Auch werden Antiproteasen des Lungengewebes inaktiviert und Onkogene angeschaltet, so dass auf lange Sicht sogar ein Karzinomwachstum gefördert werden könnte (91).

Über die akute Schädigung hinausgehend führt die toxische Zellschädigung durch freie Radikale zu einer Proliferation von Fibroblasten und einer Deposition von Kollagen im Interstitium. Langfristige Folge einer solchen Schädigung ist eine Lungenfibrose (91).

Durch das Hinzufügen von reduziertem Glutathion zur Konservierungslösung als Radikalfänger für die reaktiven Sauerstoffmoleküle sollte Celsior[®] die eben beschriebenen Schädigungen besser verhindern können als die Niederkalium-Dextranlösungen, zu denen Perfadex[®] gehört. In unseren Versuchen war die Oxygenierungsfähigkeit jedoch in der Perfadex[®]-Gruppe am Ende der Reperusionsperiode signifikant besser als in den mit Celsior[®] konservierten Organen, so dass sich diese theoretische Überlegenheit in der Praxis nicht nachweisen lässt.

Als guter Marker, um eine grobe Übersicht über das Ödem in einem konservierten Organ zu erhalten, kann der Nass/Trockengewichtsquotient gelten. In den mit Celsior[®] konservierten Organen war dieser höher als in den mit Perfadex[®] konservierten Lungen, ohne jedoch ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen.

Bei der morphometrischen Auswertung des Anteils dessen, was als Parenchym gewertet wurde, war im Gesichtsfeld eine eindeutige Rarefizierung des Gewebes in der Celsior[®]-Gruppe zu verzeichnen. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ($p=0,02$). Damit kongruent zeigt sich auch ein signifikant erhöhter alveolärer Luftanteil ($p=0,01$). Dies spricht für eine Überblähung der mit Celsior[®] konservierten Organe.

Bei der Betrachtung der histologischen Präparate unter 400facher Vergrößerung zeigt sich, dass die Konservierung der feinen alveolären Struktur in der mit Perfadex[®] konservierten Gruppe besser gelingt als mit Celsior[®]. Die Organe der Celsior[®]-Gruppe zeigen deutlich ausgesackte Alveolen, es zeigt sich auch hier das Bild einer überblähten Lunge.

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch die Konservierung mit Celsior® im Vergleich zu Perfadex® histologisch eine schlechtere strukturelle Beschaffenheit erreichen lässt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von FEHRENBACH *et al.* (24,25), die allerdings den Vergleich mit Euro-Collins durchführten, ist die Strukturpräservierung von Celsior® derjenigen von Perfadex® unterlegen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den funktionellen Parametern wieder.

Bei der Bestimmung des produzierten Malondialdehyd (MDA) stellte sich eine eindeutig signifikante Verringerung der Lipidperoxidation durch die Verwendung von Celsior® als Konservierungslösung dar. Die Peroxidation von Lipidmolekülen führt im Endeffekt zum Verlust der Funktionsfähigkeit und Integrität der Zellmembran und wird vor allem durch die Schädigung durch freie Sauerstoffradikale verursacht. Die Messung des MDA konnte daher auch als Marker für die Effektivität des reduzierten Glutathions dienen, welches Celsior® als Radikalfänger zugesetzt worden war.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass durch die Verwendung von Celsior® im Vergleich mit Perfadex® kein Vorteil zu erzielen ist.

Die erfolgreiche Elimination der während der Reperfusion entstehenden freien Sauerstoffradikale, durch die deutliche Verminderung des Malondialdehyds nachgewiesen, führt nicht zum Durchbruch bei der Funktionsfähigkeit des Organs nach 24stündiger Ischämie in der ersten Stunde der Reperfusion. Der niedrigere mittlere pulmonalarterielle Druck deutet auf eine geringere Schädigung der Endothelzellen in der pulmonalen Strombahn hin. Dennoch ist die Funktionsfähigkeit der mit Perfadex® konservierten Lungen, gemessen an der Sauerstoffsättigung, gegen Ende der Reperfusionszeit signifikant besser.

Auch die strukturelle Beschaffenheit der Organe lässt sich durch die Verwendung von Celsior® in Vergleich mit der bisherigen Standardlösung in der Lungentransplantation nicht verbessern. Sowohl die Ödementwicklung, gemessen am Nass-/Trockengewichtsquotienten, als auch die histologisch-morphometrische Auswertung der Organe konnte hier einen Vorteil in der Perfadex®-Gruppe zeigen.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation der Lunge hat sich im Laufe der Zeit für Patienten, die an einer terminalen Erkrankung dieses Organs, wie dem Emphysem oder der zystischen Fibrose leiden, zu einer lebensrettenden Behandlungsmethode entwickelt.

Seit der ersten klinischen Verpflanzung einer Lunge beim Menschen 1963 (37) wurden verschiedene Techniken erprobt, um die mögliche Zeit zwischen Explantation und Reimplantation zu verlängern, beziehungsweise die Organfunktion im Anschluss zu verbessern. In dieser Zeit werden weder Nährstoffe zu- noch Stoffwechselprodukte abgeführt, was zu einer erheblichen Schädigung führen kann.

In der heutigen Praxis hat sich mit dem sogenannten *Single Flush* ein einfaches und effektives Verfahren durchgesetzt. Dabei wird das Organ bei der Entnahme aus dem Spender mit einer Konservierungslösung perfundiert, welche den Problemen der Ischämie entgegenwirken soll. Die Lösung, die momentan am häufigsten verwendet wird, ist die Euro-Collins-Lösung.

In verschiedenen Studien wurden jedoch neuere Lösungen getestet, die sich experimentell als überlegen gegenüber EC erwiesen haben. Eine dieser Lösungen ist Perfadex[®], eine Lösung mit niedrigem Kaliumgehalt und einem hochmolekularen Dextrananteil. Im Vergleich mit Euro-Collins konnten damit deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden (49,102). Auch nach 48 Stunden Ischämiedauer wurden gute Resultate verzeichnet (26).

Eine weitere Komposition mit gutem Erfolg im Tierversuch ist Celsior[®]. Hier wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, in der Ischämiezeit entstandene Sauerstoffradikale unschädlich zu machen. Im Vergleich mit Euro-Collins konnten hiermit sowohl funktionell als auch histologisch im Kleintiermodell überlegene Resultate erreicht werden (8,24,25,97).

Bis heute existiert allerdings kein direkter Vergleich dieser beiden experimentell am erfolgreichsten erprobten Lösungen in einem Grosstiermodell. In einem Kleintierversuch deutete sich jedoch eine leichte Überlegenheit der Konservierung mit Celsior[®] an (99).

Ziel dieser Arbeit war es, an einem möglichst physiologischen und gut auf den klinischen Alltag übertragbaren Modell einen solchen Vergleich durchzuführen.

Dazu wurden Herz-Lungen-Pakete von Schweinen bei der Entnahme mit der jeweiligen Lösung perfundiert. Anschliessend erfolgte eine Lagerung dieser Organe über 24 Stunden bei 10 °C. Die folgende Reperfusion wurde an einem extrakorporalen Kreislauf durchgeführt. Die arterielle Zufuhr des Blutes erfolgte durch eine pulsatil gesteuerte Rollerpumpe via *Arteria pulmonalis*. Der venöse Abfluss konnte über den eingeschnittenen linken Vorhof erfolgen. Zur Überprüfung des Konservierungserfolges wurden venöse und arterielle Blutgase sowie pulmonalarterieller Druck gemessen und die Bestimmung des Malondialdehyd und des Nass/Trockengewichtsquotienten durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine histologische Auswertung der Präparate mittels Morphometrie.

Die Ergebnisse unserer Experimente ergaben keinen Vorteil der Konservierung des Organs mit Celsior[®] als Konservierungslösung. Sowohl die strukturelle Integrität der Organe als auch die Funktionsfähigkeit waren in der mit Perfadex[®] konservierten Lungen denjenigen Organen der Celsior[®]-Gruppe überlegen. Am deutlichsten waren die Unterschiede gegen Ende der einstündigen Reperfusionphase. Es muss festgehalten werden, dass sich die theoretischen Vorteile aus dem Zusatz von reduziertem Glutathion in der Zusammensetzung von Celsior[®] nicht in einem klinischen Vorteil niederschlagen.

Es bleibt zu vermuten, dass die Dysfunktion der Endothelien sowie der Pneumozyten, die in beiden Gruppen festzustellen war, als multifaktorielles Geschehen auf einer zum Teil molekularen Ebene stattfindet, welche sich mit

den hier verwandten Methoden nicht darstellen ließ. Um eine optimale Konservierungslösung zu erhalten, die speziell auf die Bedürfnisse der Lunge zugeschnitten ist, müssen noch weitere Erkenntnisse erhalten werden.

Abbildungen und Schemata

- Abb. 1 (S.34): Lunge nach Entnahme
- Abb. 2 (S.36): Detailaufnahme pulsatile Pumpmodul
- Abb. 3 (S.42): Pulmonaler Inspirationsdruck
- Abb. 4 (S.43): Mittlerer pulmonalarterieller Druck in mmHg
- Abb. 5 (S.44): Arterielle Sauerstoffsättigung in %
- Abb. 6 (S.45): Arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg
- Abb. 7 (S.46): Malondialdehyd in μM
- Abb. 8 (S.47): Parenchymmenge als totale Anzahl der gemessenen Pixel in 100000
- Abb. 9 (S.48): Luftraum in % des Parenchymanteils
- Abb. 10 (S.49): Übersichtsaufnahme eines Schnittes mit Celsior[®] konservierter Lunge, Vergrößerung 400fach
- Abb. 11 (S.49): Übersichtsaufnahme eines Schnittes mit Perfadex[®] konservierter Lunge, Vergrößerung 400fach
- Abb. 12 (S.50): Nass/Trockengewichtsquotient
- Schema 1 (S.32): Narkose
- Schema 2 (S.35): Schaubild des extrakorporalen Kreislaufs

Tabellen

Tabelle 1: Nass/Trockengewichtsquotient

| Celsior® | Perfadex® |
|-----------|-----------|
| 8,3 ± 1,7 | 7,5 ± 1,2 |

Tabelle 2: Mittlerer pulmonalarterieller Druck (PAP) in mmHg

| | Celsior® | Perfadex® |
|--------|-------------|-------------|
| 0 min | 25,0 ± 5,7 | 38,9 ± 16,7 |
| 10 min | 47,3 ± 14,7 | 47,6 ± 28,0 |
| 20 min | 52,7 ± 14,4 | 57,8 ± 29,3 |
| 30 min | 52,5 ± 14,1 | 57,6 ± 26,7 |
| 40 min | 51,5 ± 14,3 | 52,9 ± 27,2 |
| 50 min | 47,9 ± 13,9 | 50,3 ± 23,6 |
| 60 min | 43,3 ± 11,9 | 48,2 ± 20,0 |

Tabelle 3: arterielle Sauerstoffsättigung in %

| | Celsior® | Perfadex® |
|--------|-------------|---------------|
| 0 min | 95,8 ± 5,5 | 95,4 ± 3,1 |
| 10 min | 82,2 ± 8,5 | 88,1 ± 10,4 |
| 20 min | 81,2 ± 10,5 | 83,9 ± 15,0 |
| 30 min | 79,0 ± 9,6 | 82,0 ± 14,4 |
| 40 min | 75,9 ± 10,7 | 79,6 ± 10,9 |
| 50 min | 70,0 ± 9,9 | 79,7 ± 10,1 |
| 60 min | 67,1 ± 9,8 | 80,2 ± 13,0 * |

* = signifikant; Celsior® versus Perfadex®

Tabelle 4: Arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg

| | Celsior [®] | Perfadex [®] |
|--------|----------------------|-----------------------|
| 0 min | 92,0 ± 29,2 | 89,6 ± 38,8 |
| 10 min | 64,5 ± 25,5 | 68,4 ± 21,8 |
| 20 min | 53,7 ± 17,8 | 56,9 ± 13,7 |
| 30 min | 47,8 ± 11,2 | 53,8 ± 16,5 |
| 40 min | 44,0 ± 6,5 | 52,4 ± 20,5 |
| 50 min | 40,0 ± 5,0 | 50,1 ± 15,9 |
| 60 min | 38,8 ± 5,1 | 52,2 ± 17,3 * |

* = signifikant; Celsior[®] versus Perfadex[®]

Tabelle 5: pulmonaler Inspirationsdruck in mmHg

| | Celsior [®] | Perfadex [®] |
|--------|----------------------|-----------------------|
| 0 min | 29,1 ± 6,8 | 22,6 ± 3,0 |
| 10 min | 33,0 ± 5,2 | 28,6 ± 5,2 |
| 20 min | 34,7 ± 5,5 | 32,3 ± 7,3 |
| 30 min | 35,4 ± 5,3 | 33,2 ± 7,8 |
| 40 min | 35,8 ± 5,3 | 34,6 ± 7,1 |
| 50 min | 36,6 ± 5,3 | 35,8 ± 7,5 |
| 60 min | 36,7 ± 5,3 | 36,2 ± 7,5 |

Tabelle 6: Malondialdehyd in µM

| | Celsior [®] | Perfadex [®] |
|--------|----------------------|-----------------------|
| 10 min | 4,3 ± 2,0 | 5,9 ± 1,5 |
| 30 min | 4,1 ± 1,5 * | 6,7 ± 1,4 |
| 50 min | 5,2 ± 1,9 * | 7,3 ± 1,6 |

* = signifikant; Celsior[®] versus Perfadex[®]

6. Literaturverzeichnis

1. Aebe, R., Keenan, R.J., Hardesty, R.L., Yousem, S.A., Hamamoto, I., Griffith, B.P. (1992)
University of Wisconsin solution for pulmonary preservation in a rat transplant model
Ann. Thorac. Surg., 53, 240-6
2. Albes, J.M., Fukuse, T., Brandes, H., Wilhelm, A., Fischer, F., Hausen, B., Demertzis, S., Wahlers, T., Schäfers, H.-J. (1995)
Vergleich alternativer Lungenkonservierungslösungen im extrakorporalen Ratten-Herz-Lungen-Modell
Z. Herz-, Thorax-, Gefäßchir., 9, 155-163
3. Allison, R.C., Kyle, J., Adkins, W.K., Prasad, V.R., McCord, J.M., Taylor, A.E. (1990)
Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance
J. Appl. Physiol., 69, 597-603
4. Astier, A., Paul, M. (1989)
Instability of reduced glutathione in commercial Belzer cold storage solution
Lancet , 2, 556-557
5. Baldan, N., Toffano, M., Cadrobbi, R., Codello, L., Calabrese, F., Bacelle, L., Rigotti, P. (1997)
Kidney preservation in pigs using Celsior, a new organ preservation solution
Transplant. Proc., 29, 3539-40
6. Baldwin, J.C., Frist, W.H., Starkey, T.D., Harjula, A., Starnes, V.A., Stinson, E.B., Oyer, P.E., Shumway, N.E. (1987)
Distant graft procurement for combined heart and lung transplantation using pulmonary artery flush and simple topical hypothermia for graft preservation
Ann. Thorac. Surg., 43, 670-73
7. Barie, P.S., Hakim, T.S., Malik, A.B. (1981)
Effect of pulmonary artery occlusion and reperfusion on extravascular fluid accumulation
J. Appl. Physiol., 50, 102-106

8. Barr, M.L., Nishanian, G.P., Sakamaki, Y., Carey, J.N., Chang, J., Starnes, V.A. (1997)
A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in decreasing lung reperfusion injury
Transplant. Proc., 29, 1357-58
9. Baz, M.A., Tapson, V.F., Roggli, V.L., van Trigt, P., Piantadosi, C.A. (1996)
Glutathione depletion in epithelial lining fluid of lung allograft patients
Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 153, 742-6
10. Belzer, F.O., Southard, J.H. (1988)
Principles of solid-organ preservation by cold storage
Transplantation, 45, 673-676
11. Bresticker, M.A., LoCicero, J., Oba, J., Greene, R. (1992)
Successful extended lung preservation with UW solution
Transplantation, 54, 780-84
12. Bryan, C.L., Cohen, D.J., Dew, J.A., Trinkle, J.K., Jenkinson, S.G. (1991)
Glutathione decreases the pulmonary reimplantation response in canine lung autotransplants
Chest , 100, 1694-1702
13. Bryan, C.L., Patefield, A.J., Cohen, D., Nielsen, J.L., Emanuel, B., Calhoun, J.H. (1994)
Assessment of injury in transplanted and nontransplanted lungs after 6h of cold storage with glutathione
J. Appl. Physiol., 76, 1232-41
14. Cavanagh, S.P., Gough, M.J., Homer-Vanniasinkam S. (1998)
The role of the neutrophil in ischaemia-reperfusion injury: potential therapeutic interventions
Cardiovascular Surgery, 6, 112-118
15. Chen, C.-Z., Gallagher, R.C., Ardery, P., Dyckman, W., Donahue, S., Low, H.B.C. (1997)
Retrograde flush and cold storage for twenty-two to twenty-five hours lung preservation with and without prostaglandin E₁
J. Heart Lung Transplant., 16, 658-66
16. Chen, C.-Z., Gallagher, R.C., Ardery, P., Dyckman, W., Low, H.B.C. (1996)
Retrograde versus antegrade flush in canine left lung preservation for six hours
J. Heart Lung Transplant., 15, 395-403

17. Collins, G.M., Bravo-Shugarman, M., Terasaki, P.I. (1969)
Kidney preservation for transportation
Lancet, 2, 1219-22
18. Cooper, J.D. (1987)
Lung transplantation: A new era
Ann. Thorac. Surg., 44, 447-48
19. D'Alessandro, A.M., Southard, J.H., Love, R.B., Belzer, F.O. (1994)
Organ preservation
Surg. Clin. North. Am., 74, 1083-95
20. DeCampos, K.N., Keshavjee, S., Liu, M., Slutsky, A.S. (1998)
Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs
J. Heart Lung Transplant., 17, 599-607
21. Deneke, S.M., Fanburg, B.L. (1980)
Normobaric oxygen toxicity of the lung
N. Engl. J. Med., 303, 76-86
22. Detterbeck, F.C., Keagy, B.A., Paull, D.E., Wilcox, B.R. (1990)
Oxygen free radical scavengers decrease reperfusion injury in lung transplantation
Ann. Thorac. Surg., 50, 204-10
23. Eppinger, M.J., Jones, M.L., Deeb, M., Bolling, S.F., Ward, P.A. (1995)
Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung
J. Surg. Res., 58, 713-718
24. Fehrenbach, A., Ochs, M., Wittwer, T., Cornelius, J., Fehrenbach, H., Wahlers, T., Richter, J. (1999)
Stereological estimation of the volume weighted mean volumes of alveoli and acinar pathways in the rat lung to characterise alterations after ischaemia/reperfusion
J. Anat., 194, 127-135
25. Fehrenbach, A., Wittwer, T., Cornelius, J., Ochs, M., Fehrenbach, H., Wahlers, T., Richter, J. (1999)
Improvement of rat lung structure and function after preservation with Celsior
J. Surg. Res., 82, 285-293
26. Fujimura, S., Handa, M., Kondo, T., Ichinose, T., Shiraishi, Y., Nakada, T. (1987)
Successful 48-hour simple hypothermic preservation of canine lung transplants
Transplant. Proc., 19, 1334-36

27. Fujimura, S., Kondo, T., Handa, M., Yamauchi, A., Okabe, T., Shionozaki, F., Nakada, T. (1985)
Successful 24-Hour preservation of canine lung transplants using modified extracellular fluid
Transplant. Proc., 17, 1466-67
28. Fukuse, T., Albes, J.M., Wilhelm, A., Bande, T., Fischer, F., Hausen, B., Rohde, R., Wahlers, T., Schäfers, H.J. (1996)
Influence of dextrans on lung preservation: Is the molecular weight important?
J. Heart Lung Transplant., 15, 903-10
29. Fukuse, T., Albes, J.M., Brandes, H., Takahashi, Y., Demertzis, S., Schäfers, H.-J. (1996)
Comparison of low-potassium Euro-collins solution and standard Euro-Collins solution in an extracorporeal rat heart-lung model
Eur. J. Cardiothorac. Surg., 10, 621-627
30. Grace, P.A. (1994)
Ischaemia-reperfusion injury
Br. J. Surg., 81, 637-647
31. Geertsma, A., TenVergert, E.M., Bonsel, G.J., de Boer, W.J., van der Bij, W. (1998)
Does lung transplantation prolong life? A comparison of survival with and without transplantation
J. Heart Lung Transplant., 17, 511-16
32. Gnaiger, E., Kuznetsov, A.V., Königsrainer, A., Margreiter, R. (2000)
Autooxidation of glutathione in organ preservation solutions
Transplant. Proc., 32, 14
33. Hajjar, G.B., Toledo-Pereyra, L.H., MacKenzie, G.H. (1987)
Twenty-four hour heart-lung preservation and oxygen free radical scavengers
Transplant. Proc., 19, 1342-44
34. Hakim, M., Higenbottam, T., Bethune, D., Cory-Pearce, R., English, T.A.H., Kneeshaw, J., Wells, F.C., Wallwork, J. (1988)
Selection and procurement of combined heart and lung grafts for transplantation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 95, 474-9
35. Hardesty, R.L., Aeba, R., Armitage, J.M., Kormos, R.L., Griffith, B.P. (1993)
A clinical trial of University of Wisconsin solution for pulmonary preservation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 105, 660-6

36. Hardesty, R.L., Griffith, B.P. (1987)
Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 93, 11-18
37. Hardy, J.D., Webb, W.R., Dalton, M.L., Walker, G.R. (1963)
Lung homotransplantation in man
JAMA, 186, 1065-1074
38. Haverich, A. (1999)
Experience with lung transplantation
Ann. Thorac. Surg., 67, 305-12
39. Haverich, A., Scott, W.C., Jamieson, S.W. (1985)
Twenty years of lung preservation - A review
J. Heart Transplant., 4, 234-240
40. Hoffmann, H., Müller, C., Sakamaki, F., Daum, C., Meßmer, K., Schildberg, F.W. (1997)
Aktivierung neutrophiler Granulozyten während Ischämie der Lunge und Reperfusion nach Transplantation: Effekt der Konservierungslösungen Euro-Collins und Low-Potassium-Dextran
Z. Herz- ,Thorax- ,Gefäßchir., 11, 108-114
41. Hopkinson, D.N., Moninder, S.B., Hooper, T.L. (1998)
Pulmonary graft preservation: A worldwide survey of current clinical practice
J. Heart Lung Transplant., 17, 525-31
42. Horgan, M.J., Lum, H., Malik, A.B. (1989)
Pulmonary edema after pulmonary artery occlusion and reperfusion
Am. Rev. Resp. Dis., 140, 1421-28
43. Hosenpud, J.D., Bennett, L.E., Keck, B.M., Boucek, M.M., Novick, R.J. (2001)
The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Eighteenth official report – 2001
J. Heart Lung Transplant., 20, 805-815
44. Jackson, R. M., Veal, C. F. (1990)
Effect of hypoxia and reoxygenation on lung glutathione system
Am. J. Physiol., 259, H518-H524
45. Jamieson, N.V., Sundberg, R., Lindell, S., Claesson, K., Moen, J., Vreugdenhill, P.K., Wight, D.G.D., Southard, J.H., Belzer, F.O. (1988)
Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution
Transplantation, 46, 517-522

46. Jamieson, S.W., Stinson, E.B., Oyer, P.E., Baldwin, J.C., Shumway, N.E. (1984)
Operative technique for heart-lung transplantation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 87, 930-935
47. Katz, A., Oldham, K.T., Guice, K.S., Coran, A.G. (1993)
Reperfusion injury following single-lung transplantation: The tissue glutathione response
J. Pediatr. Surg., 28, 1301-6
48. Katz, A., Oldham, K.T., Guice, K.S., Coran, A.G. (1995)
Oxidized glutathione as a marker of ischemia reperfusion associated with single lung transplantation
J. Am. Coll. Surg., 180, 25-32
49. Keshavjee, S.H., Yamazaki, F., Cardoso, P.F., McRitchie, D.I., Patterson, G.A., Cooper, J.D. (1989)
A method for safe twelve-hour pulmonary preservation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 98, 529-34
50. Keshavjee, S.H., Yamazaki, F., Yokomise, H., Cardoso, P.F., Mullen, J.B.M., Slutsky, A.S., Patterson, G.A. (1992)
The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 103, 314-25
51. Kevelaitis, E., Mouas, C., Menasche, P. (1996)
Poststorage diastolic abnormalities of heart transplants: Is vascular dysfunction or myocardial contracture the culprit?
J. Heart Lung Transplant., 15, 461-9
52. Kim, J.D., Baker, C.J., Danto, S.I., Starnes, V.A., Barr, M.L. (2000)
Modulation of pulmonary Na^+ -pump gene expression during cold storage and reperfusion
Transplantation, 70, 1016-1020
53. Kimblad, P.O., Sjöberg, T., Massa, G., Solem, J.-O., Steen, S. (1991)
High potassium contents in organ preservation solutions cause strong pulmonary vasoconstriction
Ann. Thorac. Surg., 52, 523-8
54. Kirk, A.J.B., Colquhoun, I.W., Dark, J.H. (1993)
Lung preservation: A review of current practice and future directions
Ann. Thorac. Surg., 56, 990-1000

55. Kirk, A.J.B., Conacher, I.D., Corris, P.A., Dark, J.H. (1990)
Single flush perfusion with Euro-Collins solution in lung preservation:
clinical assessment of early graft function
Transplant. Proc., 22, 2238-39
56. Kon, N.D., Hines, M.H., Harr, C.D., Miller, L.R., Taylor, C.L., Cordell, A.R.,
Mills, S.A. (1991)
Improved lung preservation with cold air storage
Ann. Thorac. Surg., 51, 557-62
57. Konstantinov, I.E. (1998)
A mystery of Vladimir P. Demikhov: The 50th anniversary of the first
intrathoracic transplantation
Ann. Thorac. Surg., 65, 1171-7
58. Marchevsky, A.M., Gil, J., Jeanty, H. (1987)
Computerized interactive morphometry in pathology: current
instrumentation and methods
Hum. Pathol., 18, 320-331
59. McCord, J.M. (1985)
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury
N. engl. J. med., 312, 159-163
60. Menasche, P., Grousset, C., Gauduel, Y., Piwnica, A. (1986)
A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solutions
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 92, 264-271
61. Menasche, P., Piwnica, A. (1989)
Free radicals and myocardial protection: A surgical viewpoint
Ann. Thorac. Surg., 47, 939-45
62. Menasche, P., Pradier, F., Grousset, C., Peynet, J., Mouas, C., Bloch, G.,
Piwnica, A. (1993)
Improved recovery of heart transplants with a specific kit of preservation
solutions
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 105, 353-63
63. Menasche, P., Pradier, F., Peynet, J., Grousset, C., Mouas, C., Bloch, G.,
Piwnica, A. (1991)
Limitation of free radical injury by reduced glutathione: An effective means
of improving the recovery of heart transplants
Transplant. Proc., 23, 2440-42
64. Menasche, P., Termignon, J.L., Pradier, F., Grousset, C., Mouas, C.,
Alberici, G., Weiss, M., Piwnica, A., Bloch, G. (1994)
Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution
Eur. J. Cardiothorac. Surg., 8, 207-13

65. Mühlbacher, F., Langer, F., Mittermayer, C. (1999)
Preservation solutions for transplantation
Transplant. Proc., 31, 2069-70
66. Novick, R.J., Gehman, K.E., Ali, I.S., Lee, J. (1996)
Lung preservation: The importance of endothelial and alveolar type II cell integrity
Ann. Thorac. Surg., 62, 302-14
67. Novick, R.J., Menkis, A.H., McKenzie, F.N. (1992)
New trends in lung preservation: A collective review
J. Heart Lung Transplant., 11, 377-92
68. Oka, T., Puskas, J.D., Mayer, E., Cardoso, P.F.G., Shi, S., Wisser, W., Slutsky, A.S., Patterson, G.A. (1991)
Low-potassium UW solution for lung preservation
Transplantation, 52, 984-88
69. Okubo, K., Kosaka, S., Isowa, N., Hirata, T., Hitomi, S., Yodoi, J., Nakano, M., Wada, H. (1997)
Amelioration of ischemia - reperfusion injury by human thioredoxin in rabbit lung
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 113, 1-9
70. Parks, D.A., Bulkley, G.B., Granger, D.N. (1983)
Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation
Surgery, 94, 428-32
71. Patterson, G.A., Cooper, J.D. (1988)
Status of lung transplantation
Surg. Clin. North. Am., 68, 545-558
72. Patterson, G.A., Cooper, J.D., Dark, J.H., Jones, M.T. (1988)
Experimental and clinical double lung transplantation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 95, 70-74
73. Paull, D.E., Keagy, B.A., Kron, E.J., Wilcox, B.R. (1989)
Reperfusion injury in the lung preserved for 24 hours
Ann. Thorac. Surg., 47, 187-92
74. Pernot, A.C., Ingwall, J.S., Menasche, P., Grousset, C., Bercot, M., Piwnica, A., Fossel, E.T. (1983)
Evaluation of high-energy phosphate metabolism during cardioplegic arrest and reperfusion: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study
Circulation, 67, 1296-1303

75. Pietri, S., Culcasi, M., Albat, B., Alberici, G., Menasche, P. (1994)
Direct assessment of the antioxidant effects of a new heart preservation solution, Celsior
Transplantation, 58, 739-42
76. Ploeg, R.J., Goossens, D., McAnulty, J.F., Southard, J.H., Belzer, F.O. (1988)
Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution
Transplantation, 46, 191-196
77. Puskas, J.D., Cardoso, P.F.G., Mayer, E., Shi, S., Slutsky, A.S., Patterson, G.A. (1992)
Equivalent eighteen-hour lung preservation with low-potassium dextran or Euro-Collins solution after prostaglandin E₁ infusion
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 104, 83-9
78. Reignier, J., Mazmanian, M., Chapelier, A., Alberici, G., Menasche, P., Weiss, M., Herve, P. (1995)
Evaluation of a new preservation solution: Celsior in the isolated rat lung
J. Heart Lung Transplant., 14, 601-4
79. Reitz, B.A., Hunt, S.A., Gaudiani, V., Wallwork, J., Qyer, P.E., Baumgartner, W.A., Jamieson, S.W., Stinson, E.B., Shumway, N.E. (1983)
Clinical heart-lung transplantation
Transplant. Proc., 15, 1256-59
80. Reitz, B.A., Wallwork, J.L., Hunt, S.A., Pennock, J.L., Billingham, M.E., Oyer, P.E., Stinson, E.B., Shumway, N.E. (1982)
Heart-lung transplantation
N. Engl. J. Med., 306, 557-64
81. Riise, G.C., Williams, A., Kjellström, C., Schersten, H., Andersson, B.A., Kelly, F.J. (1998)
Bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients is associated with increased neutrophil activity and decreased antioxidant status in the lung
Eur. Respir. J., 12, 82-88
82. Rinaldi, M., Martinelli, L., Volpato, G., Minzioni, C., Goggi, C., Mantovani, V., Viganò, M. (1995)
University of Wisconsin solution provides better lung preservation in human lung transplantation
Transplant. Proc., 27, 2869-2871

83. Roberts, R.F., Nishanian, G.P., Carey, J.N., Sakamaki, Y., Starnes, V.A., Barr, M.L. (1999)
A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury
Transplantation, 67, 152-155
84. Semik, M., Möller, F., Lange, V., Bernhard, A., Toomes, H. (1990)
Comparison of Euro-Collins and UW-1 solutions for lung preservation using the parabiotic rat model
Transplant. Proc., 22, 2235-36
85. Spaggiari, L., Alfieri, R., Rusca, M., Carbognani, P., Cattelani, L., Bobbio, A., Petronini, P.G., Borghetti, F.A., Bobbio, P (1998)
The effect of free-radical-scavenger system "N-Acetylcysteine/Glutathione" for hypothermic prolonged lung cells preservation
J. Cardiovasc. Surg., 39, 253-4
86. Spaggiari, L., Bobbio, P. (1994)
Dextran 40 at 2% versus 5% in low-potassium solutions: Which is best?
Ann. Thorac. Surg., 58, 1784-86
87. Steen, S., Kimblad, P.O., Sjöberg, T., Lindberg, L., Ingemansson, R., Massa, G. (1994)
Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex
Ann. Thorac. Surg., 57, 450-7
88. Steen, S., Sjöberg, T., Massa, G., Ericson, L., Lindberg, L. (1993)
Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution
Ann. Thorac. Surg., 55, 434-40
89. Toronto Lung Transplantation Group (1986)
Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis
N. Engl. J. Med., 314, 1140-5
90. Ueno, T., Yokomise, H., Oka, T., Puskas, J., Mayer, E., Slutsky, A.S., Patterson, G.A. (1991)
The effect of PGE₁ and temperature on lung function following preservation
Transplantation, 52, 626-630
91. Vallyathan, V., Shi, X. (1997)
The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases
Environ. Health. Perspect., 105 (Suppl. 1), 165-77

92. Veith, F.J., Sinha, S.B.P., Graves, J.S., Boley, S.J., Dougherty, J.C. (1971)
Ischemic tolerance of the lung: The effect of ventilation and inflation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 61, 804-10
93. Wahlberg, J.A., Love, R., Landegaard, L., Southard, J.H., Belzer, F.O.
(1987)
72-hour preservation of the canine pancreas
Transplantation, 43, 5-8
94. Wang, L.-S., Yoshikawa, K., Miyoshi, S., Nakamoto, K., Hsieh, C.-M.,
Yamazaki, F., Cardoso, P.F.G., Schäfers, H.-J., Brito, J., Keshavjee, S.H.,
Patterson, A., Cooper, J.D. (1989)
The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a
simple ex vivo rabbit model used for functional assessment
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 98, 333-42
95. Willet, K.E., Jobe, A.H., Ikegami, M., Kovar, J., Sly, P.D. (2001)
Lung morphometry after repetitive antenatal glucocorticoid treatment in
preterm sheep
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 163, 1437-1443
96. Wittwer, T., Fehrenbach, A., Meyer, D., Brandes, H., Albes, J., Richter, J.,
Wahlers, T.
Retrograde flush perfusion with low-potassium solutions for improvement
of experimental pulmonary preservation
J. Heart Lung Transplant., 19, 976-983
97. Wittwer, T., Wahlers, T., Cornelius, J.F., Elki, S., Haverich, A. (1999)
Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of
lung preservation in an ex vivo rat model
Eur. J. Cardio-thorac. Surg., 15, 667-671
98. Wittwer, T., Wahlers, T., Fehrenbach, A., Cornelius, J.F., Elki, S., Ochs,
M., Fehrenbach, H., Albes, J., Haverich, A., Richter, J. (1999)
Combined use of prostacyclin and higher perfusate temperatures further
enhances the superior lung preservation by celsior solution in the isolated
rat lung
J. Heart. Lung. Transplant., 18, 684-692
99. Wittwer, T., Wahlers, T., Fehrenbach, A., Elki, S., Haverich, A. (1999)
Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact
of storage time on early post-ischemic function
J. Heart. Lung. Transplant., 18, 1198-1201
100. Xiong, L., Legagneux, J., Wassef, M., Oubenaissa, A., Detruit, H., Mouas,
C., Menasche, P. (1999)
Protective effects of Celsior in lung transplantation
J. Heart. Lung. Transplant., 18, 320-327

101. Yacoub, M.H., Khaghani, A., Banner, N., Tajkarimi, S., Fitzgerald, M. (1989)
Distant organ procurement for heart and lung transplantation
Transplant. Proc, 21, 2548-50
102. Yamazaki, F., Yokomise, H., Keshavjee, S.H., Miyoshi, S., Cardoso, P.F., Slutsky, A.S., Patterson, G.A. (1990)
The superiority of an extracellular fluid solution over Euro-Collins solution for pulmonary preservation
Transplantation, 49, 690-94

8. Abkürzungen

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| avDCO ₂ | Arterio-venöse Kohlendioxidifferenz |
| avDO ₂ | Arterio-venöse Sauerstoffdifferenz |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EC | Euro-Collins Lösung |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| GSH | reduziertes Glutathion |
| GSSG | oxidiertes Glutathiondimer |
| H ⁺ | Proton |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| IE | Internationale Einheiten |
| IL 1 | Interleukin 1 |
| KCL | Kaliumchlorid |
| KG | Körpergewicht |
| LPD | low potassium dextran (Niederkaliumhaltige Dextranlösung) |
| MDA | Malondialdehyd |
| MG | Massengewicht |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| mM | Millimol |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| mOsmol | Milliosmol |
| NAC | N-Acetyl-L-Cystein |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nikotin-Adenin-Dinukleotid (reduziert) |
| NADH | Nikotin-Adenin-Dinukleotid (oxidiert) |
| NaOH | Natronlauge |
| NO | Stickstoffoxid |

| | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------|
| O ₂ | Sauerstoff |
| O ₂ ⁻ | Superoxid-Anion |
| OH ⁻ | Hydroxylradikal |
| PAF | Platelet activating factor (Plättchenaktivierender Faktor) |
| PAP | Pulmonalarterieller Druck |
| saO ₂ | Arterielle Sauerstoffspannung |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| TNF _α | Tumornekrosefaktor α |
| UW | University of Wisconsin Lösung |
| W/D-Ratio | Nass/Trockengewichtsquotient |

Danksagung

Zuvorderst gebührt mein Dank Prof. Dr. Ziemer für die Erlaubnis, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Des weiteren danke ich Herrn PD Dr. Johannes Albes, nicht nur für die freundliche Überlassung des Themas und die kritische Durchsicht des Manuskriptes, sondern vor allem für die Freude und den Enthusiasmus, den er durch seine Begeisterung für sein Fachgebiet und die klinische Forschung in diesem Bereich auch in mir geweckt hat.

Des weiteren gebührt mein Dank Herrn Dr. Harald Brandes für die Betreuung während der experimentellen Phase dieser Arbeit und die Korrektur und konstruktive Mitarbeit an der Fertigstellung des Manuskriptes.

Auch den Mitarbeitern im Forschungslabor der Herz-,Thorax-,Gefäßchirurgie in der Calwer Strasse sei für ihre Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dietz und seinen Mitarbeitern im Institut für Medizinische Biometrie und Informationsverarbeitung der Universität Tübingen für ihre kompetente und konstruktive Mitarbeit.

Curriculum vitae

Geboren am 10.04.1975 in Tübingen als Kind des Karl-Heinz Kalinka und der Michaela Kalinka

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1981 - 1984 | Besuch der Gottlieb-Rühle-Grundschule in Mössingen |
| 1985 - 1994 | Besuch des Quenstedt - Gymnasiums in Mössingen |
| 06/1994 | Abitur |
| 09/1994 - 10/1995 | Zivildienst in Balingen auf einer Station der Abteilung Innere Medizin im Bereich der Pflege |
| 10/1995 | Aufnahme des Studiums der Medizin an der Eberhard- Karls-Universität Tübingen |
| 8-9/1997 | Physikum |
| 8/1998 | Erstes Staatsexamen |
| 11/1999 | USMLE Step 1 |
| 2/1998 – 10/2001 | Arbeit als studentische Aushilfe in der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen |
| 3/1998 | Famulatur in der Anästhesie am Kreiskrankenhaus Balingen |
| 3/1999 | Famulatur in der Herz-,Thoraxchirurgie am Royal Brompton Hospital in London |
| 7-8/1999 | Famulatur in der Kardiologie am Krankenhaus Wien-Lainz |
| 9/1999 | Famulatur in einer Radiologischen Praxis in Reutlingen |
| 4/2000 | Famulatur am King's County Hospital in Brooklyn, New York im Bereich Emergency Medicine |
| 8/2000 | 2.Staatsexamen |
| 10/2000 – 09/2001 | praktisches Jahr am Katharinenhospital Stuttgart und am Johannesburg General Hospital, Johannesburg, Südafrika |
| 11/2001 | 3.Staatsexamen |
| 11/2001 – 12/2002 | AiP in der onkologischen Abteilung des Katharinenhospitals Stuttgart |
| seit 1/2003 | AiP/Assistenzarzt im Institut für Radiologische Diagnostik am Katharinenhospital Stuttgart |