

Aus der
Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

Entwicklung einer intra- und postoperativen normothermen
Perfusionsmaschine mit generierter Zwerchfellbewegung für
die Langzeitleberperfusion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Kriegsmann, Julian

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. R. Plentz

Tag der Disputation: 16.07.2025

*Ich widme diese Arbeit
meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben,
meinem großen Bruder, meinem Vorbild von klein auf
und meiner Freundin, die für mich die Sonne, der Mond und die Sterne ist.*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	12
1.1. Leber als essenzielles Stoffwechselorgan	12
1.2. Aktuelle Situation	13
1.3. Lebertransplantation	15
1.3.1. Indikationsstellung	15
1.3.2. Operationstechniken	17
1.3.3. Komplikationen	21
1.3.4. Ischämie und ischämischer Reperfusionsschaden	22
1.3.5. Statische Kühlung	25
1.4. Erweiterung des Spenderpools	27
1.5. Maschinelle Leberperfusion zur ex vivo Konservierung	28
1.5.1. Maschinelle Perfusionssysteme	30
1.5.2. Beurteilung Lebervitalität	33
1.5.3. Klinische Anwendung MP	35
1.6. Makroskopische Anatomie Schweineleber	41
1.7. Fragestellung und Zielsetzung	43
2. Material und Methoden	44
2.1. Studiendesign	44
2.2. Spendertiere	45
2.3. Entwicklung Primäres NLP-System	45
2.4. Basis Versuchsdurchführung	48
2.4.1. Basis Hepatektomie	48
2.4.2. Basis Perfusionsmedium	49
2.4.3. Basis Durchführung Normotherme Leberperfusion	49
2.4.4. Basis Medikation	49
2.4.5. Basis Datenerhebung	50

2.5. Vorversuche Normotherme Leberperfusion Primärkreislauf	51
2.5.1. Zielsetzung	51
2.5.2. Versuchsdurchführung	51
2.5.3. Versuchsergebnisse	52
2.5.4. Versuchsanalyse Vorversuche	57
2.6. Entwicklung sekundäres NLP-System	59
2.6.1. Physiologische Bewegung der Leber	59
2.6.2. Filtersystem mit integriertem Wasserschloss	60
2.6.3. Dialyse	61
2.6.4. Parenterale Nährstoffzufuhr	62
2.6.5. Stase-Prophylaxe während Hepatektomie	62
2.6.6. Standardisierter Medikationsplan	63
2.6.7. Sekundärkreislauf	64
2.7. Experiment NLP im Sekundärkreislauf	65
2.7.1. Zielsetzung	65
2.7.2. Versuchsdurchführung	65
2.7.3. Versuchsergebnisse	66
2.7.4. Versuchsanalyse	68
2.8. Erste Standardversuchsreihe	69
2.8.1. Zielsetzung	69
2.8.2. Versuchsdurchführung	69
2.8.3. Versuchsergebnisse	69
2.8.4. Versuchsanalyse	74
2.9. Entwicklung Tertiärkreislauf	75
2.9.1. Entwicklung arterieller Katheter	76
2.9.2. Optimierung Zirkulationskreislauf	77
2.9.3. Druckkontrollierter venöser Abfluss	77
2.9.4. Optimierung Gaszufuhr	77
2.9.5. Entwicklung gerinnungsfreies Medium	78
2.9.6. Intraoperative Normotherme Leberperfusion	79
2.10. Zweite Standardversuchsreihe	80
2.10.1. Zielsetzung	80

2.10.2. Versuchsdurchführung	80
2.10.3. Versuchsergebnisse	83
2.10.4. Versuchsanalyse	88
2.11. Kontrollversuche	89
2.11.1. Zielsetzung	89
2.11.2. Versuchsdurchführung	89
2.11.3. Versuchsergebnisse	90
2.11.4. Versuchsanalyse	91
3. Ergebnisse	92
3.1. Vergleich E1-NLP-SK und SVR1	92
3.2. Vergleich Sekundäres und Tertiäres Leberperfusionssystem	93
3.3. Vergleich Kontrollversuche	95
4. Diskussion	98
5. Zusammenfassung	115
6. Literaturverzeichnis	117
7. Erklärung zum Eigenanteil	127
8. Veröffentlichungen und Kongressteilnahme	128
9. Danksagung	129

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung Nr. 1: *Diagnosestellung bei Registrierung auf Warteliste für Lebertransplantation; Organ Procurement and Transplantation Network USA 2022 (S. 13)*
- Abbildung Nr. 2: *An- und Abmeldungen der Spenderorganliste Leber 2013 bis 2021 Deutschland, DSO-Jahresberichte (S. 14)*
- Abbildung Nr. 3: *Leberspender von 1988 bis 2021 in den USA, Organ Procurement and Transplantation Network (S. 15)*
- Abbildung Nr. 4: *Punkteberechnung, Berechnungsformeln u. Gradeinteilung für Indikationsstellung: CTP-Score; ALBI-Grad; MELD-Score (S. 16)*
- Abbildung Nr. 5: *Strukturzeichnung OrganOx Metra®; Oxford, UK (S. 30)*
- Abbildung Nr. 6: *Strukturzeichnung Liver Assist; Groningen, Niederlande (S. 31)*
- Abbildung Nr. 7: *Strukturzeichnung Cleveland NMP-Kreislauf; Cleveland, Ohio (S. 31)*
- Abbildung Nr. 8: *Strukturzeichnung (a) u. Foto (b) Liver4Live; Zürich, Schweiz (S. 32)*
- Abbildung Nr. 9: *Schematische Darstellung einer Schweineleber (S. 41)*
- Abbildung Nr. 10: *Schematische Darstellung des Studiendesigns (S. 44)*
- Abbildung Nr. 11: *Primäres Normothermes Leberperfusionssystem (S. 46)*
- Abbildung Nr. 12: *Strukturzeichnung Primäres Leberperfusionssystem (S. 47)*
- Abbildung Nr. 13: *Hepatektomie Präparation (S. 48)*
- Abbildung Nr. 14: *Blutgasanalyse und Laborauswertung VV2-NLP-PK (S. 54)*
- Abbildung Nr. 15: *Histologie und Makroskopie VV2-NLP-PK (S. 55)*
- Abbildung Nr. 16: *Blutgasanalyse und Laborauswertung VV3-NLP-PK (S. 56)*
- Abbildung Nr. 17: *Physiologische Leberbewegung (S. 59)*
- Abbildung Nr. 18: *Filtersystem mit integriertem Wasserschloss (S. 60)*
- Abbildung Nr. 19: *Strukturzeichnung Sekundäres Leberperfusionssystem (S. 64)*
- Abbildung Nr. 20: *Blutgasanalyse und Laborauswertung E1-NLP-SK (S. 67)*
- Abbildung Nr. 21: *Histologie und Makroskopie E1-NLP-SK (S. 68)*
- Abbildung Nr. 22: *Blutgasanalyse SVRI (S. 70)*
- Abbildung Nr. 23: *Laboranalyse SVRI (S. 72)*
- Abbildung Nr. 24: *Histologie, Makroskopie und Analyse Medium SVRI (S. 73)*

- Abbildung Nr. 25: *Strukturzeichnung Tertiäres Leberperfusionssystem (S. 75)*
- Abbildung Nr. 26: *Tertiäres Leberperfusionssystem (S. 76)*
- Abbildung Nr. 27: *Entwicklung arterieller Katheter (S. 76)*
- Abbildung Nr. 28: *Mobiles Leberperfusionssystem (S. 79)*
- Abbildung Nr. 29: *Strukturzeichnung Mobiles Leberperfusionssystem (S. 80)*
- Abbildung Nr. 30: *Blutgasanalyse SVR2 (S. 84)*
- Abbildung Nr. 31: *Laboranalyse SVR2 (S. 86)*
- Abbildung Nr. 32: *Histologie und Analyse Perfusionsmedium SVR2 (S. 87)*
- Abbildung Nr. 33: *Laboranalyse KV-SCS (S. 91)*
- Abbildung Nr. 34: *Laboranalyse EI-NLP-SK und SVR1 (S. 93)*
- Abbildung Nr. 35: *Laboranalyse SVR1 und SVR2 (S. 95)*
- Abbildung Nr. 36: *Laboranalyse Kontrollversuche (S. 97)*

Tabellenverzeichnis

- Tabelle Nr. 1: *Risikoeinteilung Lebertransplantate anhand ECD (S. 28)*
- Tabelle Nr. 2: *Segmentunterteilung einer Schweineleber (S. 42)*
- Tabelle Nr. 3: *Herstellung SAGM-Lösung in 100 ml Ampuwa® (S. 49)*
- Tabelle Nr. 4: *Standard-antimikrobielle-Medikation (SAM) (S. 50)*
- Tabelle Nr. 5: *Basisdaten VV-NLP-PK (S. 52)*
- Tabelle Nr. 6: *Standardmedikationsplan (S. 63)*
- Tabelle Nr. 7: *Basisdaten SVR1 (S. 70)*
- Tabelle Nr. 8: *Medikamentengabe SVR1 (S. 73)*
- Tabelle Nr. 9: *Basisdaten SVR2 (S. 83)*
- Tabelle Nr. 10: *Medikamentengabe SVR2 (S. 87)*
- Tabelle Nr. 11: *Basisdaten KV-SCS (S. 90)*
- Tabelle Nr. 12: *Basisdaten Versuche (S. 92)*
- Tabelle Nr. 13: *Postoperative Enzymkonzentration SVR2 und KV-SCS (S. 96)*

Abkürzungsverzeichnis

A

ALT / GPT	Alanin-Aminotransferase / Glutamat-Pyruvat- Transaminase
ALV	Akutes Leberversagen
AST / GOT	Aspartat-Aminotransferase / Glutamat-Oxalacetat- Transaminase
aNRP	Abdominelle normotherme regionale Perfusion
ATP	Adenosintriphosphat

B

BGA	Blutgasanalyse
-----	----------------

C

CIT	Cold ischemic time
CLV	Chronisches Leberversagen
COR	Controlled oxygenated rewarming
CTP-Score	Child-Turcotte-Pugh-Score

D

DBD	Donation after brain death
DCD	Donation after cardial death
DHC	Ductus hepaticus choledochus
D-HOPE	Dual hypothermic oxygenated machine perfusion
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation

E

EAD	Early Allograft Dysfunction
ECD	Extended criteria donors
ECMO	Extracorporale Membranoxygenierung
EK	Erythrozytenkonzentrat
E-NLP-SK	Experiment NLP Sekundärkreislauf
E-NLP-TK	Experimenten NLP Tertiärkreislauf

H

H.E.	Hämatoxylin Eosinfärbung
Hb	Hämoglobin
HCV	Hepatitis C Virus
HMP	Hypothermic machine perfusion
HOPE	Hypothermic oxygenated machine perfusion
HTK	Histidin-Tryptophan- Ketoglutarat-Lösung

I

IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
IRI	Ischemia reperfusion injury

K

KV-SCS	Kontrollversuche mit Statischer Kühlung
--------	--

L		S	
LDLT	Living donor liver transplantation	SAM	Standard-antimikrobielle-Medikation
LG	Lebergewicht	SCS	Static cold storage
LP	Leberperfusionszeit	siRNA	Small interfering RNA
LTx	Lebertransplantation	SK	Sekundärkreislauf
M		SMP	Subnormothermische Maschinenperfusion
MELD-Score	Model for End-stage-Liver Disease	SVR1	Erste Standard Versuchsreihe
miRNA	MikroRNA	SVR2	Zweite Standard Versuchsreihe
MMP	Mittelthermische Maschinenperfusion	T	
MP	Maschinelle Perfusion	TK	Tertiärkreislauf
N		TPG	Transplantationsgesetz
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer	TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
NMP	Normotherme Maschinenperfusion	U	
NLP	Normotherme Leberperfusion	UW	University of Wisconsin Lösung
P		VV-NLP-	Vorversuche Normothermen
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck	PK	Leberperfusion Primären Kreislauf
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie	W	
PK	Primärkreislauf	WIT	Warm ischemic time
PNF	Primary non function		
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck		
R			
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale		

Stoffmengen- und Maßeinheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
g	Gramm
G	Gewichtskraft
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheit
l	Liter
min	Minuten
mmHg	Millimeter- Quecksilbersäule
mol	Mol
rpm	Rounds per minute
U	Unit
V	Volt

Mio.	Millionen	10^6
k	Kilo	10^3
d	Dezi	10^{-1}
c	Zenti	10^{-2}
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}

Chemische Summenformeln

Ca^{2+}	Kalzium-Ionen
CaCl_2	Kalziumchlorid
Cl^-	Chlorid-Ionen
CO_2	Kohlenstoffdioxid
H^+	Wasserstoffionen
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
K^+	Kalium-Ionen
Na^+	Natrium-Ionen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoff
O^{2-}	Superoxidanionen
OH^-	Hydroxid-Ionen

1. Einleitung

1.1. Leber als essenzielles Stoffwechselorgan

Die Leber ist das im Zentrum stehende Stoffwechselorgan des Menschen und an vielen essenziellen Vorgängen im Körper beteiligt: Als größte Drüse des menschlichen Körpers übernimmt sie eine entscheidende Rolle innerhalb des Intermediärstoffwechsels durch die Bereitstellung und Regulation des Energiehaushaltes. Darüber hinaus besitzt die Leber eine Speicherfunktion und ist von fundamentaler Bedeutung sowohl für die Synthese als auch für die Entgiftung und Ausscheidung physiologischer und pathologischer Stoffe.

Verschiedene Erkrankungen resultieren in einem teilweisen oder kompletten Versagen der Organfunktion und bilden die therapeutische Indikation einer Lebertransplantation (LTx). Dabei ist diese für das Endstadium von Lebererkrankungen, wie das chronische Leberversagen (CLV) und das akute Leberversagen (ALV) häufig die einzige kurative Therapieoption. Zu den vielfältigen Ursachen des CLVs gehören chronische Virusinfektionen, wie Hepatitis C und B, Alkoholabusus und metabolische Syndrome, wie die nichtalkoholische Fettlebererkrankung und die nichtalkoholische Steatohepatitis (1). Das CLV resultiert häufig aus einem Untergang von Hepatozyten und überschießenden bindegewebigen Reparaturvorgängen mit der Ausbildung von Pseudolobuli, Regenerationsknoten und Bindegewebssepten in einer Leberzirrhose (2). Die strukturelle Umwandlung des Leberparenchyms beinhaltet weiterhin einen progressiv verminderten Austausch zwischen den hepatischen Sinusoiden und dem angrenzenden Leberparenchym durch den Verlust der endothelialen Fenestrationen innerhalb des Disse-Raums (sinusoidale Kapillarisation) sowie eine Unterbrechung der Gallenkanälchen und Sinusoiden und eine intrahepatische Shuntbildung zwischen der Pfortader und V. cava mit dem Resultat einer portalen Hypertension, einer Minderperfusion und einer exokrinen und metabolischen Leberfunktionsstörung (3). Ersichtlich an den auf der Warteliste neu registrierten Patienten/-innen für eine Lebertransplantation für das Jahr 2022 (*Organ Procurement and Transplantation Network*) in den USA bildete die Leberzirrhose mit über 70 % die häufigste Indikationsstellung einer LTx (*Abbildung Nr. 1*) (4). Das akute Leberversagen (ALV) wird definiert als plötzlich auftretende Form der Leberinsuffizienz mit möglichem letalem Ausgang, ohne im Vorfeld bestehende Lebererkrankung (5). Zu den Ursachen

eines ALVs werden unter anderem Arzneimittel, insbesondere die Paracetamol-Intoxikation, die Leberischämie und die virale und Autoimmunhepatitis gezählt (5). Innerhalb des letzten Jahrzehnts stieg die Rate der durchgeführten Lebertransplantationen bei ALV auf etwa 25 % als lebensrettende Behandlungsoption an, wodurch die Gesamtsterblichkeit von 80 % auf 33 % sank (5). Mit 11 % aller registrierten Patienten/-innen auf der Warteliste sind die malignen Neoplasien eine häufige Diagnose bei der Indikation zur

LTx (4). Dabei ist der häufigste Lebertumor das hepatozelluläre Karzinom, das in 80 % der Fälle infolge einer zirrhotischen

Leber entsteht (6).

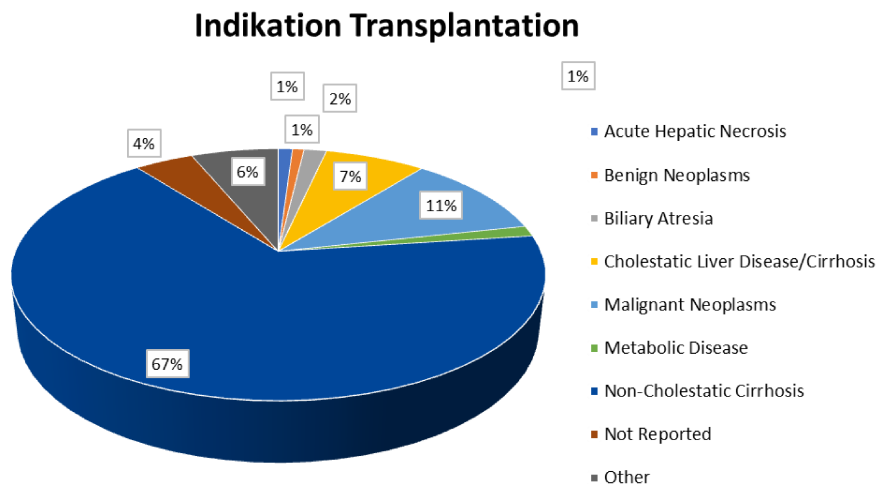
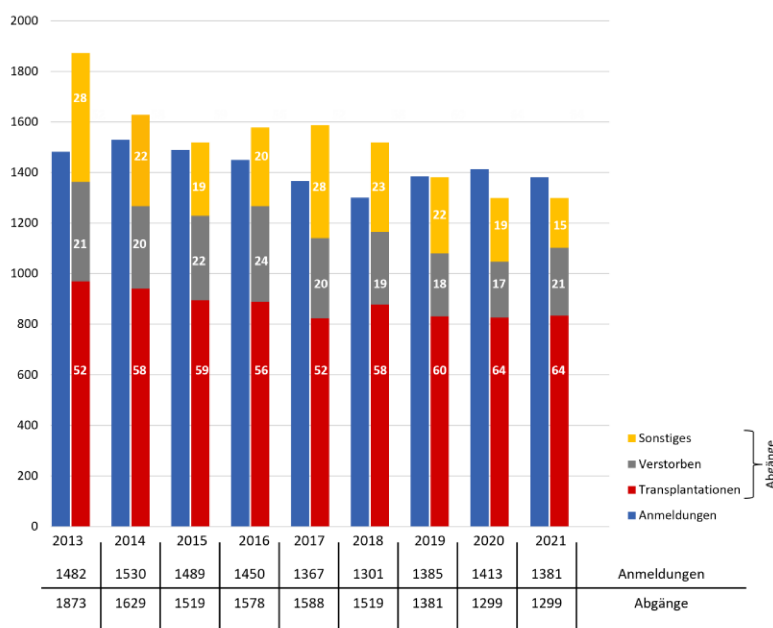


Abbildung Nr. 1: Diagnosestellung bei Registrierung auf Warteliste für Lebertransplantation; Organ Procurement and Transplantation Network USA 2022 (4)

1.2. Aktuelle Situation

In Deutschland unterliegt die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Gewebe dem Transplantationsgesetz (TPG) (7). Dieses Gesetz sieht vor, dass die Bereiche Organspende, Organvermittlung und Organtransplantation in unterschiedlichen Einrichtungen voneinander getrennt werden (7). Dabei übernimmt die 1984 gegründete Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) als Koordinierungsstelle den Bereich der Organspende (8). Die Organvermittlung wird von der gemeinnützigen Stiftung Eurotransplant innerhalb der Länder Belgien, Deutschland, Kroatien, Luxemburg, den Niederlanden, Österreich, Ungarn und Slowenien übernommen (9). Die Organtransplantation darf laut TPG nur in dafür zugelassenen Transplantationszentren durchgeführt werden (7). Derzeit gibt es in Deutschland 45 Kliniken mit einer entsprechenden Zertifizierung (8).

Laut dem Jahresbericht *Organspende und Transplantation in Deutschland 2021* der DSO wurden im Zeitraum von 1963 bis Ende 2021 in Deutschland insgesamt 146.087 Organe transplantiert (8). Die Leber war dabei mit 27.929 das zweit häufigste transplantierte Organ (8). Im Jahr 2021 gab es insgesamt 1.381 Anmeldungen auf der Warteliste für eine Leberorganspende und 1.299 Abgänge (8). Dabei wurden 834 Transplantationen durchgeführt und 268 Patienten/-innen verstarben, während sie auf eine Organspende warteten (8). Zum Stichtag 31.12.2021 wurden 2.058 Patienten/-innen für dieses Jahr auf der Warteliste registriert (8). Bei den durchgeführten Transplantationen handelte es sich



mit einer Anzahl von 780 zu 94 % um eine LTx nach postmortalen Organspende (DCD) (8). Anhand der Daten zwischen 2013 und 2021 wird ersichtlich, dass ca. 20 % aller Patienten/-innen auf der Warteliste verstarben, während sie auf ein Organ warteten (*Abbildung Nr. 2*) (8, 10).

Abbildung Nr. 2: An- und Abmeldungen der Spenderorganliste Leber 2013 bis 2021 Deutschland, DSO-Jahresberichte (8, 10)

Die Daten der Organisation *Organ Procurement and Transplantation* geben die aktuelle Spendersituation innerhalb der USA wieder (4). Laut dieser wurden bis zum 12. September 2022 insgesamt 6.298 Lebertransplantationen durchgeführt (4). Obwohl die Zahl der Spender/-innen seit dem Jahr 1988 um mehr als das 5-fache gestiegen ist, warten derzeit 11.286 Patienten/-innen auf der Warteliste für eine Lebertransplantation, während lediglich 6.877 Spenden erfolgten (*Abbildung Nr. 3*) (4). Die Anzahl der Menschen, die

bereits über 5 Jahre auf ein Spenderorgan warten, lag bei 1.199 Patienten/-innen (4). Von den Organspenden waren innerhalb der letzten 10 Jahre 96 % DCD-Spenderlebern (4).

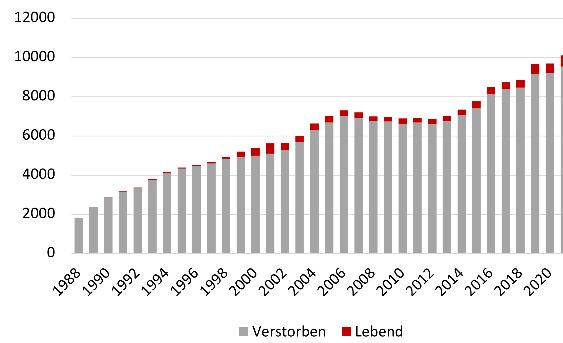


Abbildung Nr. 3: Leberspender von 1988 bis 2021 in den USA, Organ Procurement and Transplantation Network (4)

1.3. Lebertransplantation

Im Jahr 1963 wurde in den USA durch den Chirurgen Thomas E. Starzl die erste Lebertransplantation durchgeführt (11). Während der erste Patient bereits auf dem Operationstisch verstarb, überlebten die folgenden Patienten/-innen bis zu 22 Tage nach der Operation (11). Möglich wurde dies durch Errungenschaften im 20. Jahrhundert, wie dem entdeckten Blutgruppen-AB0-System durch Landsteiner (12) und der Erforschung des menschlichen Immunprozesses und dessen Suppression (13). In Deutschland wurde die erste Lebertransplantation im Jahr 1969 an der Bonner Universitätsklinik durchgeführt (14). Dabei überlebte der Patient 205 Tage (14). Seit diesen ersten Schritten im Bereich der Organtransplantation konnte die Lebertransplantation zu einem Standardverfahren für Patienten/-innen mit inoperablen und fortgeschrittenen Lebererkrankungen weiterentwickelt werden.

1.3.1. Indikationsstellung

Folgeerkrankungen wie eine chronische Enzephalopathie, wiederkehrende Varizenblutungen, Aszitisentwicklung, hepatorenales- und hepatopulmonales Syndrom zeigen die Notwendigkeit einer Lebertransplantation auf. Für die objektive Indikationsbeurteilung einer Lebertransplantation und damit für eine gerechte und sinnvolle Vergabe von Spenderorganen, wurden im Laufe der Zeit mehrere Scores entwickelt: Der Child-Turcotte-Pugh-Score (CTP-Score), 1964 erstmals von Child und Turcotte publiziert (15) und 1972 von Pugh modifiziert (16), kann sowohl für die

Stadieneinteilung als auch zur Prognoseabschätzung verwendet werden. Die Kriterien beinhalten die Laborwerte Serum-Bilirubin, Serum-Albumin, Quick- oder INR-Wert und den klinischen Befund einer Aszites und einer hepatischen Enzephalopathie (17). Für die Kriterien werden 1 bis 3 Punkte vergeben, woraus sich eine Gesamtpunktezahl von 5 bis 15 Punkten errechnet (*Abbildung Nr. 4*). Aus dem Ergebnis wird eine Stadieneinteilung von A bis C vorgenommen (17). Während beim Stadium A (5 bis 7 Punkte) die 1 Jahres Überlebensrate bei 100 % liegt, ist diese bei Stadium B (7 bis 9 Punkte) bereits bei 81 % und bei Stadium C (10 bis 15 Punkte) bei 45 % (17). Um die subjektive Einschätzung der klinischen Befunde zu objektivieren wurde 2015 die alternative Einteilung anhand des ALBI-Grades eingeführt (18). Dabei wird über eine Formel (*Abbildung Nr. 4*), beruhend auf den gemessenen Albumin- und Bilirubinkonzentrationen, die Leberfunktionalität in drei Klassen gegliedert (18). Eine Einteilung, die den CTP-Score in der Transplantationsmedizin ersetzt, ist der 2002 durch das *United Network for Organ Sharing* eingeführte *MELD-Score (Model for End-stage-Liver Disease)* für Patienten/-innen älter als 12 Jahre (19). Dabei wird über eine Formel unter Bezugnahme der Laborparameter Bilirubin, Kreatin und INR der Verlauf einer schweren transplantationspflichtigen Lebererkrankung eingeschätzt (*Abbildung Nr. 4*) (19). Je höher das auf Ganzzahlen gerundete Ergebnis zwischen 6 und 40 Punkten ausfällt, desto höher liegt die Wahrscheinlichkeit, ohne Transplantation innerhalb von drei Monaten zu versterben (19). Für die Vergabe von Transplantationsorganen bei Patienten/-innen unter 12 Jahren wurde der *PELD-Score (Pediatric end-stage liver disease)* entwickelt (20). Anders als beim MELD-Score berechnet sich dieser unter Einbezug der Laborparameter Albumin, Bilirubin und INR, sowie durch das Alter der Patienten/-innen und den Grad einer Wachstumsstörung (20).

Seit der Einführung des MELD-Scores als Priorisierungsinstrument bei der Organpendenorganisation konnte die Sterblichkeit auf der Warteliste

(1.)				(2.)	
Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	<i>ALBI-Grad</i>	
Serum-Bilirubin [mg/dl] (gesamt) [µmol/l]	< 2,0 < 34	2,0-3,0 34-52	> 3,0 > 52	$= (\log_{10} \text{Bilirubin} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \right] \times 0,66) + (\text{Albumin} \left[\frac{\text{g}}{\text{l}} \right] \times -0,0852)$	
Serum-Albumin [g/dl]	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8		
Quickwert [%]	> 70	40-70	< 40	Grad 1 Ergebnis ≤ -2,60	
INR	< 1,7	1,7-2,3	> 2,3	Grad 2 " > -2,60 < -1,39	
Aszitis	keiner	mäßig	viel	Grad 3 " > -1,39	
Hepatische Enzephalopathie	keine	Stadium I-II	Stadium III-IV		

(3.)

$$\text{MELD-Score} = 9,57 \times \ln \left(\text{Serumkreatinin} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] \right) + 3,78 \ln \left(\text{Bilirubin ges.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] \right) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 6,43$$

Abbildung Nr. 4: Punktberechnung, Berechnungsformeln u. Gradeinteilung für Indikationsstellung: (1.) CTP-Score (17); (2.) ALBI-Grad (18); (3.) MELD-Score (19)

nachweislich gesenkt werden (21). Studien von Subgruppen zeigten jedoch, dass ein Teil der Patienten/-innen auf der Warteliste trotz einer hohen Indikation für eine Lebertransplantation durch die Einführung dieses Systems eine Verlängerung der Wartezeit erfuhren (22). Dies beruht z.B. auf einer hohen Variabilität des Ergebnisses aufgrund unterschiedlicher Laborverfahren und auf der Nichtberücksichtigung verschiedener Faktoren, wie beispielsweise des Geschlechts und des Vorhandenseins von Erkrankungen, wie Sarkopenie oder eines hepatozellulären Karzinoms (22). Aus diesem Grund wurden Standardausnahmekriterien definiert, durch die Sonderpunkte und damit eine verkürzte Zeit auf der Warteliste gewonnen werden konnten. Ein Beispiel dafür ist das Vorhandensein eines hepatozellulären Karzinoms in Zirrhose, beruhend auf den von Mazzaferro et al. publizierten Milan-Kriterien (23). Eine entscheidende und bereits teils angewendete Modifizierung des MELD- zum MELD-Na-Score war die Hinzunahme des Natriumserumspiegels, da dieser mit einer Aszites und einem hepatorenalen Syndrom assoziiert werden kann und die Intensität einer portalen Hypertension widerspiegelt (24). Weitere Scores zur Optimierung der Organverteilung sind unter anderem der durch Luca et al. vorgestellte *integrated MELD*-Score (iMELD) (25), der neben dem Natriumspiegel das Alter der Patienten/-innen berücksichtigt, der MELD-Plus-Score (26), der darüber hinaus auch die Konzentration von Albumin, Cholesterin und Leukozyten sowie die Krankenhausaufenthaltsdauer miteinschließt oder der MELD-Sarkopenie-Score (27), der neben der ursprünglichen Fassung das Vorhandensein einer Sarkopenie berücksichtigt.

1.3.2. Operationstechniken

Die Lebertransplantation ist ein interdisziplinärer Eingriff, der neben erfahrenen Chirurgen/-innen ein erweitertes Monitoring seitens der Anästhesie und eine intensive postoperative Beobachtung und Behandlungsfortsetzung auf der Intensiv Care Unit und Normalstation notwendig macht (28). Allgemein wird bei der Organspende zwischen einer Lebendspende *Living donor liver transplantation* (LDLT) und einer Totspende *Donation after Cardial Death* (DCD) bzw. *Non-Heartbeating donor* und *Donation after Brain Death* (DBD) bzw. *Heartbeating donor* unterschieden, welche ein unterschiedliches operatives Vorgehen voraussetzen. Darüber hinaus kann zwischen einer orthotopen Voll- und Teilorgantransplantation unterschieden werden. Bei der

orthotopen Volltransplantation, die nur über eine Todspende durchgeführt werden kann, unterscheidet man zwischen der mittlerweile weitgehend obsoleten *klassischen Technik* (29) und der 1968 erstmals durch R. Y. Calne beschriebenen (30) und rund 20 Jahre später durch A. Tzakis klinisch bekannt gewordenen *Piggyback-Technik* (31). Grundlegender Unterschied der *Piggyback-Technik* zur *klassischen Technik* ist der Erhalt der Vena cava des Empfängers und somit des kavalen Rückstroms während der Hepatektomie. Dadurch konnten die Komplikationen der klassischen Technik, wie z.B. Blutungen, Darmschädigungen, renale Hypoperfusion, mit einhergehender hoher Mortalitätsrate, bei komplettem Stillstand des venösen Rückstroms zum Herzen und portalem Rückstau, gesenkt werden (32). Eine weitere Operationstechnik ist die 1992 von J. Belghiti entwickelte *laterolaterale Kavokavostomie* mit partieller Ausklemmung der Empfängerhohlvene zur Rekonstruktion des hepatovenösen Abflusses (33). Drei Jahre später stellte Belghiti eine modifizierte Operationstechnik der laterolateralen Kavokavostomie mit einer temporären portokavalen Anastomose während der Hepatektomie vor, die auf die Verwendung eines extrakorporalen Bypasses komplett verzichtete (34).

Die Lebertransplantation beginnt mit der Entnahme des Spenderorgans, meist über eine Multiorganentnahme, innerhalb der Spenderklinik (32). Über eine Laparotomie und evtl. Sternotomie wird die Leber in situ dargestellt und die Transplantationsfähigkeit beurteilt (32). Mögliche Variationen der Gefäßversorgung werden über die Präparation der retroperitonealen Aorta und V. cava inferior detektiert (32). Innerhalb des Ligamentum hepatoduodenale kann die A. hepatica bis zum Truncus coeliacus dargestellt werden (32). Von essenzieller Bedeutung ist das im direkten Anschluss durchgeführte Verfahren der Statischen Kühlung der Leber *Static cold storage* (SCS) (35). Dabei wird eine Perfusion der Leber mit Konservierungsflüssigkeit über die Kanülierung der distalen Aorta unter Abklemmung bzw. Ligatur der thorakalen und iliakalen Gefäße vorgenommen (32). Über eine Inzision der V. cava wird der Abfluss des Perfusats gesichert (32). Die Pfortader und der Gallengang werden möglichst distal, die A. hepatica unter Mitnahme eines Aortenpatches und die V. hepatica mitsamt der retrohepatischen V. cava, abgesetzt, Adhäsionen gelöst und die Leber entnommen (32). Innerhalb eines sterilen Dreibeutelsystems kann sie gekühlt und transportiert werden (32). Während der Backtable-Operation innerhalb des Transplantationszentrums erfolgt ex situ eine weitere

Beurteilung sowie bei Bedarf eine Feinpräparierung und falls noch nicht vorgenommen, eine Cholezystektomie (36). Die Eröffnung des Abdomens während der Hepatektomie der Empfängerleber wird über eine quere mediane Oberbauchlaparotomie nach rechts mit medianer Erweiterung bis zum Xyphoid und evtl. zusätzlicher Erweiterung nach links (Mercedes-Schnitt) vorgenommen (32). Entsprechend der Entnahme des Spenderorgans erfolgt eine Beurteilung, Mobilisierung und Präparation der Leber (32). Die weiteren Schritte der operativen kavalen Rekonstruktion unterscheiden sich bezüglich der verwendeten Operationstechnik: Die klassische Technik wird mit einem venovenösen Bypass über die V. femoralis und V. axillaris in die V. cava superior durchgeführt (29). Eine Kanülierung der Pfortader sichert den Transport des mesenterialen Blutes über den Bypass (29). Die supra- und infrahepatische V. cava wird über Abklemmung der distal bzw. proximal liegenden Gefäßanteile abgesetzt (29). Nach Organentnahme kann über eine End-zu-End-Anastomose der Spender- mit der Empfängerkava der venöse Blutfluss wieder hergestellt werden (29). Bei der Piggyback-Technik erfolgt eine partielle Abklemmung und Absetzung hepatischer Venen und eine Verbindung dieser mit der Empfängerkava über eine Seit-zu-Seit- oder End-zu-Seit-Anastomose während der Organimplantation (37, 38). Für die Laterolaterale Kavokavostomie nach Belghiti werden die Lebervenen mit einem Stapler abgesetzt (33). Bei der Rekonstruktion der Hohlvene wird der anteriore Anteil der Empfängerkava mit einer Satinskyklemme ausgeklemmt und eine Kavotomie sowohl der Spender-, als auch Empfängerkava durchgeführt (33). Anschließend erfolgt eine laterolaterale Kavokavostomie mit fortlaufender Naht (33). Allen Operationstechniken gemein ist die Auswaschung der Konservierungslösung vor dem vollständigen Verschluss der infrahepatischen V. cava inferior (32). Sowohl die Rekonstruktion der Pfortader durch eine End-zu-End-Anastomose als auch die Rekonstruktion der A. hepatica mit der Branch-patch-Technik, bei der die A. hepatica propria der Spender- mit der A. gastroduodenalis der Empfängerleber anastomosiert wird, erfolgt bei allen Operationstechniken in der Regel gleich (32). Die Gallenwegsrekonstruktion kann über eine End-zu-End- oder End-zu-Seit-Choledochocholedochostomie mit evtl. Einlage einer T-Drainage durchgeführt werden. Eine weitere Option ist die biliodigestive Anastomose nach Y-Roux (32).

Ein weiter entwickeltes Verfahren der Lebertransplantation ist die orthotope Leberteileresektion, die sowohl über eine Lebendspende als auch über eine Todspende

erfolgen kann: Für die Transplantation von erwachsenen Spendern/-innen auf pädiatrische Patienten/-innen wurde die 1980 durch Bismuth entwickelte Methode der Transplantatverkleinerung verwendet (39). Dabei blieb jedoch durch die Größenanpassung der Leber ein Teil des Transplantats ungenutzt (39). Bei der von Pichlmayr et al. (40) und Bismuth et al. (41) im Jahr 1988 und 1989 erstmalig beschriebenen *Split-Liver-Transplantation* (SLP) wird der verworfene Teil weitertransplantiert, sodass über eine Leberspende zwei Patienten/-innen versorgt werden können. Für die Transplantation haben sich verschiedene Techniken etabliert, wie das *Full-right/Full-left Splitting* oder das *Left-lateral Splitting*, bei dem die Spenderleber entlang des Lig. falciforme unter Beachtung der Segmentgrenzen und Beibehaltung der vaskulären und biliären Zu- und Abflusswege in ein rechtes erweitertes Transplantat mit den Segmenten I, II und V bis VIII für Erwachsene und ein links laterales Transplantat mit den Segmenten II und III für pädiatrische Patienten/-innen geteilt wird (42). Zu erwähnen ist hier die Unterscheidung verschiedener Operationstechniken: Die In-situ-Technik, bei der die Hilärdissektion und Parenchymdurchtrennung intraabdominell vor der Konservierung durch eine Perfusionslösung und Kühlung erfolgt und die Ex-vivo-Technik, bei der das Verfahren entsprechend einer Backtable-Operation mit dem gekühlten Organ durchgeführt wird (43).

Die ersten klinischen Versuche zur LDLT erfolgten 1988 durch Raia et al (44). Ein Jahr später wurde durch Strong et al. die erste erfolgreiche Lebertransplantation einer Mutter auf ihren 17 Jahre alten Sohn durchgeführt (45). Der erste erfolgreiche Fall einer Leberlebenspende zwischen Erwachsenen konnte erst 1994 verzeichnet werden, wobei der Empfänger erst 17 Jahre nach der Operation verstarb (46). Heute ist die LDLT ein wichtiger Baustein bei der Transplantationstherapie. Spezielle Verfahren der LDLT sind die *Dual-graft-Transplantation*, bei der Teillebern von zwei Spender/-innen genutzt werden und so das Risiko eines *Small-for-size-Syndroms* minimiert wird (47) und die *Dominotransplantation*, bei der das Organ des Spendenempfängers bei einer vorhandenen isolierten Stoffwechsellebererkrankung, wie z.B. einer familiären amyloidoischen Polyneuropathie, weiter transplantiert wird (48).

1.3.3. Komplikationen

Bei der Lebertransplantation gibt es zahlreiche Komplikationen mit einem stark heterogenen Spektrum der Schweregrade und folgender therapeutischer Interventionsmöglichkeiten. Allgemein hängt die Prognose der Komplikationsschwere vom Zustand des Spenderorgans, des Empfängers, der Operationstechnik und ihrer fehlerfreien Ausführung ab. Die Komplikationen einer Lebertransplantation lassen sich in chirurgische und nicht-chirurgische Problematiken unterscheiden, wobei sich die Chirurgischen weiter in vaskuläre und biliäre Komplikationen gliedern:

Zu den häufigsten vaskulären Komplikationen gehören die Problematiken der zu- und abfließenden Gefäße: Darunter fallen Anastomosen-Blutungen, sowie akute und chronische Stenosen der Arterie, als auch der Pfortader, hepatischer Venen und der V. cava inferior (49). Ursache dafür können Thrombosen und Aneurysmen sein, ausgelöst durch anatomische Anomalien, veränderte Durchmesser oder abknickende Gefäße, eine verlängerte ischämische Zeit, eine AB0-Inkompatibilität, Low-Flow-Zustände, fehlerhafte Operationstechniken, eine akute Abstoßung oder Infektionen (49). Bei dem großen Spektrum an biliären Komplikationen handelt es sich unter anderem um Leckagen, Strikturen, Obstruktionen, Gallensteine, Funktionsstörungen des Oddi-Schließmuskels und Rezidive primär biliärer Erkrankungen, wie einer primär sklerosierenden Cholangitis und einer primär biliären Zirrhose (50). Eine fehlende Blutversorgung der Gallengänge über kleine Leberarterien und den peribiliären Gefäßplexus kann zu einer ischämischen Cholangiopathie führen mit akuten und chronischen Folgen (51). Zu den nicht chirurgischen Komplikationen gehört beispielsweise die postoperative Infektion, die in der frühen Phase nach der Transplantation durch die Einnahme von Immunsuppressiva bei einer zuvor bestehenden Infektion erfolgen kann und in der späten Phase zum einen durch eine Neuinfektion aufgrund eines reduzierten Immunstatus und zum anderen durch eine rezidivierende chronische Infektion (52). Eine der multifaktoriellen Komplikationen ist die Leber-Allotransplantat-Dysfunktion, die in der frühen postoperativen Phase als *Early Allograft Dysfunction (EAD)* und im Extremfall bei vollständigem Organversagen und einer notwendigen Retransplantation als *Primary Nonfunction* bezeichnet wird (53). Der Grund einer solchen Dysfunktion kann primär auf einen veränderten Stoffwechsel auf

zellulärer Ebene oder sekundär auf Sepsis, vaskuläre und biliäre Komplikationen zurückgeführt werden (53). Weitere Ursachen einer sekundären Dysfunktion sind die hyperakute Abstoßung und der nichtthrombotische Infarkt (53). Das *Small-for-Size-Syndrom* ist eine Komplikation bei einer Teilleberspende (54). Es kann definiert werden durch das Vorhandensein einer Choestase, Koagulopathie und Aszites bei fehlender Ischämie innerhalb der ersten postoperativen Woche, bedingt durch ein zu geringes Transplantatvolumen für die metabolische Bedarfsdeckung (54). Eine in Spanien durch Lladó et al. durchgeführte retrospektive Studie, die die notwendige Reimplantationsindikation unter Betrachtung der vorhandenen Komplikationen zwischen 1984 und 2018 untersuchte, ergab, dass die Hauptkomplikationen mit 27 % eine ischämische Cholangitis, mit 19 % eine arterielle Thrombose, mit 15 % eine primäre Nichtfunktion und mit 15 % ein HCV-Rezidiv waren (55).

1.3.4. Ischämie und ischämischer Reperfusionsschaden

Unter einer Ischämie versteht man die reduzierte bzw. unterbrochene Versorgung eines Gewebes mit Sauerstoff über die Blutzufuhr, die im Extremfall zu Nekrose und einem irreversiblen Funktionsverlust führt (56). Das Ausmaß einer Ischämie ist abhängig von dem individuellen Sauerstoffbedarf des zu versorgenden Organs, wodurch Gewebe mit hohem Sauerstoffbedarf eine niedrige Ischämietoleranz aufweisen (56). In der Transplantationsmedizin wird allgemein eine warme von einer kalten ischämischen Phase unterschieden (57). Die *warme ischämische Phase* (WIT) beschreibt den Zeitraum, der nach einer aufgehobenen Blutzirkulation und Ventilation des Spenders bzw. des Organs vorliegt (57). Die *kalte ischämische Phase* (CIT) beginnt mit der Perfusion des Spenderorgans durch ein kaltes Perfusionsmedium und einer fortlaufenden Kühlung bis zur Implantation und endet mit der Revaskularisierung des Organs innerhalb des Empfängerkörpers (57).

Der ischämische Reperfusionsschaden *Ischaemia reperfusion injury* (IRI) gilt als eine der Hauptursachen für die Entstehung von postoperativen Komplikationen (58). Er ist definiert als eine entzündliche Veränderung nach der Unterbrechung und Wiederherstellung der Blutzufuhr in einem Organ (58). Er unterteilt sich in eine ischämische und eine Reperusionsphase: Während der ischämischen Phase erfährt das

Parenchym aufgrund der mangelnden Blut- und damit Sauerstoffzufuhr eine Umstellung zu einer anaeroben Energiegewinnung von ATP (57). Bei der Reaktion von Pyruvat unter Katalyse durch die Laktatdehydrogenase (LDH) und Verbrauch von NADH fällt vermehrt Laktat an. Bei anhaltender anaerober Glycolyse führt dies durch die Akkumulation der Milchsäure und Bildung von Wasserstoffionen zur intrazellulären Azidose (58). Die Hochregulierung des Na^+/H^+ -Transporters, die zum Austausch der intrazellulär höher konzentrierten Wasserstoff- mit extrazellulären Natriumionen führt, resultiert in Zellschwellung und Apoptose (58). Das Erliegen der ATP- abhängigen Na^+/H^+ -Pumpe fördert diesen Prozess (58). Durch die Zellschwellung innerhalb des Parenchyms mit einhergehender Verengung der intrahepatischen Gefäße verschlechtert sich die Blutzirkulation weiter (57). Die intrazelluläre Hybernatriämie führt zu einer verstärkten Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Transporters mit resultierender intrazellulärer Hyperkalzämie, die durch eine reduzierte Ca^{2+} -ATPase in der Membran weiter gefördert wird (58). Das intrazelluläre Kalzium stimuliert Enzyme der Mitochondrien, die zur Apoptose und Nekrose führen (58).

Die Entzündungsreaktion und damit die Zellschädigung nimmt paradoxerweise nach einer Reperfusion weiter zu. Dabei liegt die Ursache in einem multifaktoriellen Prozess mit Beteiligung verschiedener Zelltypen und Signalwege: Bei der Entstehung eines IRI scheint eine übermäßige Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) ein Schlüsselfaktor zu sein (58). Verschiedene metabolische Reaktionen wie die Xanthinoxidase, die NADPH-Oxydase, die Mitochondrien und die ungekoppelte Stickoxid-Synthase gelten als wichtige ROS-Quellen (57). Beim Abbau von Nukleotiden zu Harnsäure entsteht als Nebenprodukt Hypoxanthin, das unter aeroben Bedingungen durch die Xanthin-Dehydrogenase weiter zu Xanthin oxydiert wird (58). Unter anaeroben Bedingungen wandelt sich die Xanthin-Dehydrogenase in die Xanthin-Oxydase um (58). Da Sauerstoff für die Weiterreaktion als Edukt obligat ist, fällt während der anaeroben Phase vermehrt Hypoxanthin an (58). Nach der Reperfusion entstehen durch die toxischen Mengen an Hypoxanthin ROS, wie Superoxidanionen (O_2^-), die zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyradikalen (OH^\cdot) weiter reagieren (58). ROS können durch ihre stark reduzierenden Eigenschaften die Lipidstrukturen der Zellmembran schädigen (58). Dies führt zur Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Substanzen, wie Eicosanoiden (z.B. Prostaglandine, Thromboxane

und Leukotrine) (58). Die Aktivierung von Endothelzellen resultiert in einer Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und führt somit zur Stimulierung der Adhäsionsmoleküle von Leukozyten (58).

Für einen optimalen Blutfluss innerhalb der Leber ist ein Gleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin (ET) essenziell (59). Der durch Endothelzellen freigesetzte Stickstoff setzt über die Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase einen Stoffwechselweg in Gang, der durch Dephosphorylierung von Myosin eine Vasodilatation auslöst (59). Endothelin wirkt als Antagonist über eine Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Endothelinrezeptor als Vasokonstriktor (59). Allgemein hat Stickstoff eine protektive Wirkung während der IRI (60). Dies zeigt sich durch eine Hemmung von oxidativem Stress, Freisetzung von Zytokinen und endotheliale Adhäsion von Leukozyten (60). NO wird durch die Stickstoffmonooxid-Synthase gebildet, von der es drei Isoformen, die induzierbare, die endotheliale und die neuronale Form, gibt (61). Als Reaktion auf die Ischämie wird zunächst vermehrt NO über die endotheliale Stickstoffmonooxid-Synthase produziert mit dem Ziel, das Gewebe besser zu durchbluten (58). Im weiteren Verlauf entsteht jedoch aufgrund einer Abnahme der Endothelfunktion ein Mangel an NO (58). Darüber hinaus führt der Anstieg der Superoxidanionen während der ischämischen Phase zur Reaktion von O_2^- mit NO zu Peroxynitrit und peroxynitroner Säure, woraus die zytotoxischen Stoffe NO_2 und OH^- entstehen (58). Diese Reaktion führt weiter zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit (60). Durch diesen Mangel an Stickstoff verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des Vasokonstriktors Endothelin, wodurch die Mikrozirkulation der Leber weiter gestört wird (58). Ungefähr drei Stunden nach der Reperfusion führt, ausgelöst durch die Entzündung, die induzierbare Stickstoffmonooxid-Synthase zu einer erhöhten Produktion von Stickstoff (58). Diese Überproduktion von NO führt jedoch zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion (58).

Als Peptide und Proteine haben Zytokine eine regulatorische Funktion in der Signalübertragung zwischen Zellen und sind entscheidend an der Auslösung und Aufrechterhaltung der IRI beteiligt (58). Unter den von hepatischen Ito-Zellen und Kupferzellen gebildeten Zytokinen sind zu nennen das Interleukin-1, -6 und -8, der *plättchenaktivierender Faktor* (PAF), der *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer* (NF- κ B) und der *Tumornekrosefaktor- α* (TNF- α) (58).

Kupferzellen sind hepatische Makrophagen innerhalb der Sinusoide und bilden einen wichtigen Faktor für die Entstehung eines IRI (62). Während der frühen Phase der Reperfusion produzieren sie ROS (62). Darüber hinaus synthetisieren aktivierte Kupferzellen proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1-beta und TNF- α , die die Expression von *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und *Vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1) auf der Oberfläche von Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen stimulieren und so die Aktivierung, Migration und Extravasion von CD4+ T-Zellen und neutrophilen Leukozyten im Leberparenchym hervorrufen (58). Durch die Adhäsion an die Zielzelle werden Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt (58).

Das Komplementsystem ist als Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems wesentlich beteiligt am IRI (63). So ist es sowohl bei der Aktivierung von Kupferzellen als auch an der direkten Schädigung der Hepatozyten involviert (63).

1.3.5. Statische Kühlung

Die Statische Kühlung *Static cold storage (SCS)* ist derzeit der Goldstandard zur Verlängerung der Ischämietoleranz und Prävention eines ischämischen Reperfusionsschadens (35). Das Konzept dieses Verfahrens beruht auf einer Hypothermie des Organs und der Bereitstellung essenzieller Stoffe über eine Konservierungslösung (35). Dazu wird die Spenderleber bereits in vivo mit einer gekühlten Konservierungslösung perfundiert und nach der Entnahme bis zur Implantation im Empfängerkörper bei 0 bis 5 °C gekühlt (64). Durch die künstlich erzeugte Hypothermie nimmt die Aktivität der Enzyme von normothermen Organismen pro 10 °C Temperatureniedrigung um ca. das 1,5- bis 2-fache ab (65). Bei einer Temperaturreduktion von 37 auf 0 °C liegt die Abnahme der Stoffwechselaktivität bei einem Faktor von 12 bis 13 (65). Durch diese Stoffwechselreduktion erfährt das Organ eine Abnahme des Sauerstoffbedarfs mit erhöhter Ischämietoleranz (64). Derzeit gibt es mehrere Konservierungslösungen mit unterschiedlichem Anwendungsspektrum durch eine differente Stoffzusammensetzung (64). Die dabei verwendeten Stoffe sind unter anderem Elektrolyte, Puffer, Energieträger, Antioxidantien und Osmotika (64). Die bekanntesten Konservierungslösungen (derzeit Goldstandard) sind die durch Belzer und

Southard eingeführte *University of Wisconsin Lösung* (UW) (65) und die durch Bretschneider entwickelte *Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung* (HTK) (35). Zur osmotischen Aufrechterhaltung und Prophylaxe enthält die UW-Lösung die sinusodial undurchlässigen Substanzen Raffinose, Lactobionat und Hydroxyethylstärke (66). Die Gabe des ATP-Vorläufers Adenosin und der antioxidativen Komponenten Allopurinol und reduziertem Glutathion dienen der Energiegewinnung nach Reperfusion und der Stabilisierung der Zellmembran (66). Im Gegensatz zur UW-Lösung enthält die HTK-Lösung keine Hydroxyethylstärke, wodurch die Viskosität herabgesetzt wird, und neben einem anderen Puffersystem mit Histidin eine unterschiedliche Elektrolytzusammensetzung mit einem niedrigeren Kaliumgehalt (67). Weitere elementare Bestandteile sind das Ketoglutarat und das Tryptophan als Substrat des Energiehaushaltes und zur Stabilisierung der Zellmembran (67). In den letzten zwanzig Jahren gab es mehrere Studien, die die beiden Konservierungslösungen auf Unterschiede und mögliche Vorteile miteinander verglichen. Bei Betrachtung der Studien um Mangus et al. (67) und Kaltenborn et al. (68) scheinen die beiden Lösungen klinisch gleichwertig zu sein mit nur minimalen Unterschieden, wie einem signifikanten Unterschied der AST- und ALT-Aktivitäten am ersten postoperativen Tag, bei gleichen klinischen Ergebnissen des 1-Jahres-Transplantat- und Patientenüberlebens, der primären Nichtfunktion und der 1-Monats-Erstfunktion. Eine andere Studie, die 2009 durch Stewart et al. durchgeführte Analyse der Datenbank des United Network for Organ Sharing mit 18.586 Lebern, konnte ein erhöhtes Risiko von 14 % des Transplantatverlustes bei der Verwendung von HTK nachweisen, dass bei der Verwendung von DCD-Transplantaten auf 44 % anstieg (69). Weitere Konservierungslösungen, die in der Lebertransplantationsmedizin eingesetzt werden, sind die in den 1990er Jahren entwickelte natrium- und kaliumarme Celsior-Lösung und die Lösung des Instituts Georges Lopez, die im Unterschied zur UW-Lösung statt der Hydroxyethylstärke Polyethylenglycol und eine niedrigere Kalium- und höhere Natriumkonzentration enthält (64). Darüber hinaus gibt es eine breite Forschung, die sich mit der Entwicklung von neuen Konservierungslösungen und möglichen Zusatzstoffen zu den bereits bestehenden Perfusionslösungen beschäftigt, wie der Zugabe von Hormonen (z.B. Melatonin) (70), Proteasom-Inhibitoren (z.B. Bortezomib) (71) oder anti-ischämischen Medikamenten (z.B. Trimetazidine) (72).

1.4. Erweiterung des Spenderpools

Mit dem Ziel Leben zu retten, wurde seit der ersten durchgeführten Lebertransplantation versucht, dem Bedarf an Spenderorganen gerecht zu werden. Diesem Ziel diene auch die oben aufgeführte verbesserte Allokation von Spenderorganen (21), eine Erweiterung durch Pool- und Cross-over-Spende (73), die Verbesserung der Operationstechnik (34) und die Entwicklung neuer Operationen und Prozesse, wie der Split liver donation als Lebend- oder Todspende (40, 44). Trotz des nachweislichen Erfolgs dieser Weiterentwicklungen in der Transplantationsmedizin sterben weiterhin Menschen, die auf der Warteliste für eine Leberspende stehen (4). Aus diesem Grund wurden vermehrt marginale Lebern mit so genannten erweiterten Spenderkriterien *Extended Criteria Donors* (ECD) transplantiert (74). Dies umfasst eine nicht genau definierte Gruppe von Transplantaten mit einem bestimmten Spendermerkmal, das ein potenzielles Risiko für eine Transplantatdysfunktion oder für die Übertragung von Krankheiten aufweist und aufgrund dessen normalerweise die Spenderauswahlkriterien nicht erfüllt (74). Zu den ermittelten Merkmalen gehören das Alter des Spenders, eine Spende nach Kreislaufstillstand (DCD), eine verlängerte ischämische Zeit, ein erhöhter Grad an Lebersteatose und die Verwendung von Transplantaten mit einem erhöhten Risiko einer Krankheitsübertragung, wie durch das Hepatitis-C-Virus (74). Der Gebrauch dieser Organe resultierte in einer signifikanten Erniedrigung der Wartelistenmortalität (75). Gleichzeitig wird jedoch der Gebrauch marginaler Lebern mit dem Auftreten von Komplikationen in Verbindung gebracht, wie der *frühen Allotransplantatdysfunktion* (EAD), der *primären Nichtfunktion* (PNF) oder der *ischämischen Cholangiopathie*: Die Verwendung von älteren Spenderorganen umfasst Lebern, deren Spender meist über 60 Jahre alt sind (76). Die älteren Spenderorgane haben ein erhöhtes Risiko einer verminderten Stoffwechselaktivität und Fähigkeit auf Stress zu reagieren, sowie ein höheres Risiko einer zusätzlichen Fibrose oder Steatose, die sich insbesondere in Kombination mit einer erhöhten ischämischen Zeit negativ auf das Ergebnis der Transplantation auswirken kann (76). Die Steatose ist ein häufiger Befund in der Biopsie von Spenderlebern Verstorbener und wird definiert über das Vorhandensein von Triglyceridtröpfchen innerhalb der Hepatozyten (77). Sie kann in eine makro- und mikrovaskuläre Steatose unterteilt werden (77). Dabei zeigen sich insbesondere mittelschwere und schwere makrovaskuläre Steatosen als unabhängiger prognostischer

Faktor für schlechte postoperative Allotransplantationsergebnisse (77). Durch die geschwollenen Fettheptozyten resultiert ein verengtes Sinusoidlumen mit erhöhtem intrahepatischen Gefäßwiderstand, wodurch steatotische Lebern ebenfalls für den ischämischen Reperfusionsschaden anfällig sind (78). Der Gebrauch von DCD-Spenderlebern bietet eine große Organquelle (79). Das Risiko der Entstehung einer postoperativen Komplikation korreliert mit der verlängerten ischämischen Zeit während des Prozesses der Organentnahme (79).

Allgemein lässt sich sagen, dass die Transplantation von ECD-Lebern mit dem Auftreten von Komplikationen zusammenhängt (80) (Tabelle Nr. 1). Dennoch konnten in den letzten Jahren durch eine Optimierung der Operationsprozesse und des Spender-Empfänger-Matchings, wie z.B. bei der Transplantation von älteren Spenderorganen auf

Tabelle Nr. 1: Risikoeinteilung Lebertransplantate anhand ECD (80)

Transplantationsrisiko	Definitionen
ECD-Transplantate mit geringem Risiko	DBD: Spenderalter ≤ 80 Jahre; CIT ≤ 10 h; Makrosteatose ≤ 30% DCD: Spenderalter ≤ 60 Jahre; CIT ≤ 6 h; WIT ≤ 20 min; Makrosteatose ≤ 5%
Intermediäres Risiko ECD-Transplantate	DBD: Spenderalter > 80 Jahre; CIT > 10 h; Makrosteatose > 30% DCD: Spenderalter 60-80 Jahre; CIT 6-8 h; WIT 20-30 min; Makrosteatose 5 % - 20 %
DCD-Transplantate mit hohem Risiko und abgelehnte überbeanspruchte Lebern	Spenderalter > 80 Jahre; CIT > 8-10 h, WIT > 30 min; Makrosteatose > 30 %; schlechte In-situ-Perfusion; verlängerte Entnahme; stark erhöhte Leberfunktionstests; Ablehnung aus anderen nicht vaskulären Gründen

Empfänger mit einem niedrigen MELD-Score und der Verwendung neuer apparativer Techniken zur Minimierung der ischämischen Zeit, sehr gute Transplantationsergebnisse erzielt werden (74, 76).

1.5. Maschinelle Leberperfusion zur ex vivo Konservierung

Für die Transplantation von ECD-Lebern und die Transplantationsmedizin im Allgemeinen bietet die *maschinelle Leberperfusion* (MP) das Potential, das postoperative Outcome zu verbessern und den Pool an Spenderorganen zu erweitern (81). Dabei wird das Spenderorgan zur Konservierung nach der Explantation ex vivo mit einer Perfusionslösung über eine maschinelle Konstruktion perfundiert (81). Die erste maschinelle Organperfusion wurde im Tiermodell durch Brettschneider et al. im Jahr 1967 durchgeführt (82). Dabei wurden Lebern von Hunden über einen Zeitraum von acht bis fünfundzwanzig Stunden mittels MP konserviert und anschließend transplantiert (82). Bereits ein Jahr später im Jahr 1968 wurde durch Belzer et al. eine humane Niere über 17 Stunden durch Maschinenperfusion konserviert und erfolgreich transplantiert (83). Trotz

des schnellen Erfolges der MP bei der Konservierung von Nierentransplantaten und die frühen Erfolge durch Brettschneider et al. gewann diese Technik für die Lebertransplantation erst im letzten Jahrzehnt wieder stark an Bedeutung und wurde bis dahin hauptsächlich am Tiermodell erprobt (84-86). Aufgrund einer fortschreitenden hohen Anzahl von Versuchen und Erfolgen im Bereich der maschinellen Leberperfusion schlugen Karangwa et al. im Jahr 2016 eine einheitliche Nomenklatur zur besseren Metaanalyse der Daten vor: Dabei bezogen sie sich v.a. auf den Zeitpunkt der MP und die verwendete Konservierungstemperatur (87). Die Perfusionszeit lässt sich in eine *Pre-SCS MP* und eine *Post-SCS MP*, sowie in eine Konservierungs-MP *Preservation MP* unterteilen (87). Während bei letzterer die maschinelle Perfusion den gesamten Zeitraum zwischen Explantation und Implantation über durchgeführt wird, erfolgt bei der Pre- und Post-SCS MP vor oder nach der Perfusion eine SCS (87). Durch die unterschiedliche Einstellung der Temperatur, während der MP mit resultierender differenter Stoffwechselaktivität, war für Karangwa et al. ebenfalls eine genaue Definition der Temperatur von Nöten (87). Dabei gliederten sie die maschinelle Leberperfusion in eine *hypothermische Maschinenkonservierung* mit 0°C bis 12°C, eine *Mittelthermische-MP* (MMP) mit 13°C bis 24 °C, eine *Subnormothermische-MP* (SMP) mit 25°C bis 34°C und eine *Normotherme-MP* (NMP) mit 35°C bis 38°C (87). Die hypothermische Maschinenkonservierung kann weiter in eine *Hypothermische-MP* (HMP), eine *hypotherme sauerstoffhaltige Maschinenperfusion* (HOPE) und eine *duale hypotherm oxygenierte Maschinenperfusion* unterteilt werden (88). Dabei wird bei der HMP und D-HOPE eine duale Perfusion über die Leberarterie und die Pfortader durchgeführt, während bei der HOPE nur ein Gefäß perfundiert wird (88). Der Unterschied zwischen der HMP und der D-HOPE liegt in der Oxygenierung des Perfusionsmediums bei der Durchführung der D-HOPE, die ebenfalls bei der HOPE stattfindet (88).

1.5.1. Maschinelle Perfusionssysteme

Es gibt derzeit mehrere maschinelle Leberperfusionssysteme zur ex vivo Konservierung, die teilweise bereits seit mehreren Jahren in der klinischen Lebertransplantationsmedizin Anwendung finden (89). Hauptbestandteile des Schaltkreises sind im Allgemeinen ein Blutreservoir, eine oder mehrere Pumpen, ein Oxygenator und ein Wärmeaustauscher (89). Die bekanntesten kommerziell erhältlichen MP-Systeme sind dabei das OrganOx® Metra-System (Oxford, UK) (90), der Liver Assist / Organ Assist (Groningen, Niederlande) (91), der Cleveland NMP-Kreislauf (Cleveland Clinic; Cleveland, Ohio) (92) und das Transmedics Organ Care System (Andover, Massachusetts, USA) (93). Kürzlich wurde ebenfalls das neue MP-Gerät Liver4Live-System (Zürich, Schweiz) vorgestellt, das jedoch noch nicht im klinischen Setting angewendet wird (94).

Das OrganOx Metra (*Abbildung Nr. 5*) ist für Leberperfusionen bis 24 Stunden geeignet (89). Es bietet einen kontinuierlichen dualen Fluss durch die A. hepatica und die Pfortader (89). Dabei wird das Blut durch eine Zentrifugalpumpe über einen Oxygenator in die A. hepatica, sowie in ein Reservoir gepumpt, über das die Pfortader perfundiert wird (89). Das System ist mobil und nahezu vollständig automatisiert mit einer

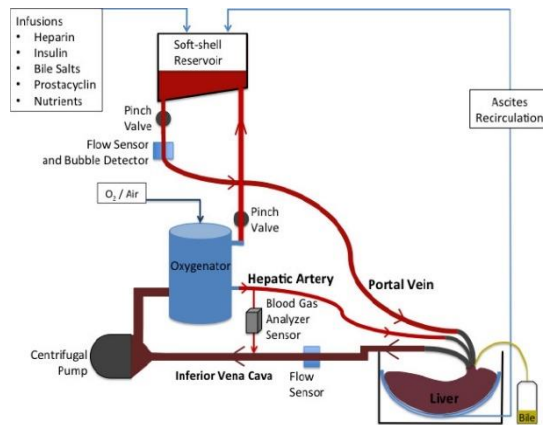


Abbildung Nr. 5: Strukturzeichnung OrganOx Metra®; Oxford, UK (89)

integrierten Blutgasanalyse (89). Der arterielle Druck, die Gaszufuhr, die Temperatur, die Messung der Galle und die Messung des Gallenausstoßes werden über einen Algorithmus geregelt (89). Das Gerät kann darüber hinaus die Gabe von Gallensalzen, Insulin, Prostacyclin, Heparin und die Zufuhr von Glukose und Aminosäuren anhand einer manuellen Gabe des Glukosespiegels infundieren (90).

Der Liver Assist / Organ Assist (*Abbildung Nr. 6*) bietet eine duale Perfusion über die Arterie (pulsatiler Fluss) und über die Pfortader (kontinuierlicher Fluss), mittels eines Systems aus einer Rotationspumpe und einem Hohlfasermembranoxygenator (91). Die Leberarterie wird über die Aorta oder die A. coelica kanüliert (91). Die V. cava inferior bleibt offen und fließt in ein Reservoir (91). Der Ductus cysticus wird ligiert und der Hauptgallengang kanüliert (91). Die Temperatureinstellung ist flexibel, sodass eine hypotherme, subnormotherme und normotherme Leberperfusion durchgeführt werden kann (91). Das Organ Assist ist nicht mobil, sodass die Leber nach Entnahme zunächst erst einmal mittels SCS bis zum Start der Perfusion konserviert werden muss (91).

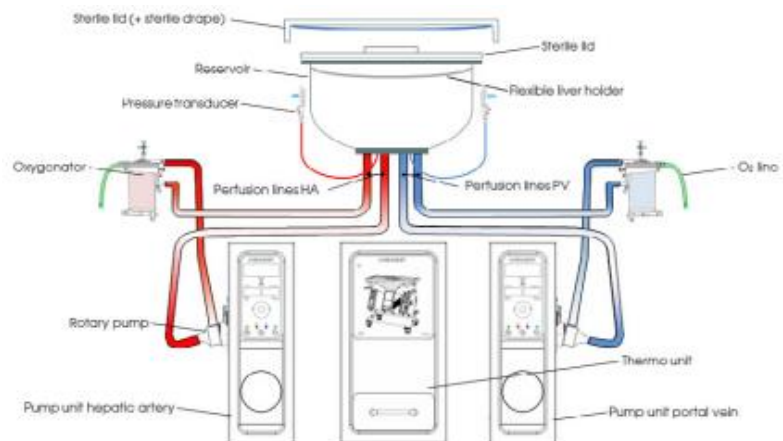


Abbildung Nr. 6: Strukturzeichnung Liver Assist; Groningen, Niederlande (91)

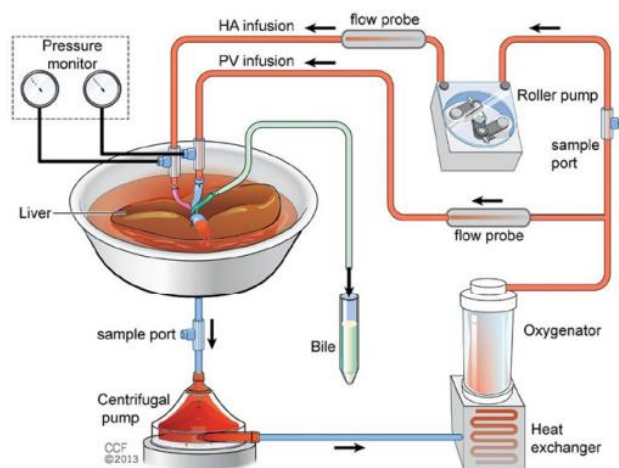


Abbildung Nr. 7: Strukturzeichnung Cleveland NMP-Kreislauf; Cleveland, Ohio (92)

Im Cleveland NMP-Kreislauf (*Abbildung Nr. 7*) liegt die Leber in einem Organgefäß, das das Perfusat aufnimmt und ebenfalls als Reservoir fungiert (92). Die Hohlvene entlässt dabei die Perfusionsflüssigkeit offen direkt in das Gefäß (92). Über eine Zentrifugalpumpe gelangt das Perfusat in einen Oxygenator und Wärmeaustauscher (92). Der Kreislauf verzweigt sich weiter in zwei Schläuche für die duale Perfusion von Pfortader und Arterie (92). Dabei wird der erhöhte arterielle Druck durch eine peristaltische Pumpe erzeugt, die gleichzeitig einen pulsatilen Fluss generiert (92). Für eine kontrollierte Perfusion besitzt das System Durchfluss-, Druck- und Temperatursonden (92).

Das TransMedics Organ Care System beinhaltet NMP-Systeme für das Herz, die Lunge und die Leber: Sowohl das Perfusionssystem für eine NLP bei 34 °C für das Herz im schlagenden Zustand, als auch das für die Lunge wurden bereits klinisch erfolgreich angewendet (95, 96). Im Jahr 2021 erhielt das System für die Leber die Zulassung durch die *Food and Drug Administration* (93). Bisher wurde noch keine Publikation zur Leberperfusion mit diesem System veröffentlicht (93).

Die Liver4Live/Longterm perfusion machine (*Abbildung Nr. 8*), entwickelt von der schweizer Gruppe um Eshmuminov et al., ist die erste voll automatische Perfusionsmaschine, die für eine NLP von sieben Tagen entwickelt wurde (94). Die Leber wird dual über die Leberarterie und die Pfortader mittels einer Zentrifugalpumpe mit Blut versorgt (94). Dabei wird bei beiden Gefäßen der Druck und der Blutfluss überwacht (94). Die arterielle Perfusion erfolgt pulsatil über eine automatische Variation der Rotationsgeschwindigkeit des Zentrifugalkopfes mit einem mittleren arteriellen Druck von 60 mmHg, 60 Schlägen pro Minute und wird über einen Oxygenator mit Sauerstoff angereichert (94). Es erfolgt eine automatische Kontrolle der Hämodynamik der Arterie durch automatische Infusion von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren (94). Der Fluss der Pfortader wird kontinuierlich mit einem Zieldruck von 5-10 mmHg und nicht oxygeniertem Blut aus dem Reservoir generiert (94). Die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Pfortader wird an die physiologischen Normalwerte durch einen Shunt zum arteriellen Schenkel angepasst (94). Es erfolgt eine Injizierung von parenteraler Ernährung und Ursodesoxycholsäure in die Pfortader (94). Die Glucosekonzentration wird innerhalb der Zirkulation gemessen und über eine automatische Verabreichung von Insulin und Glucagon in einem Zielbereich von 3,5-6,5 mmol/l gehalten

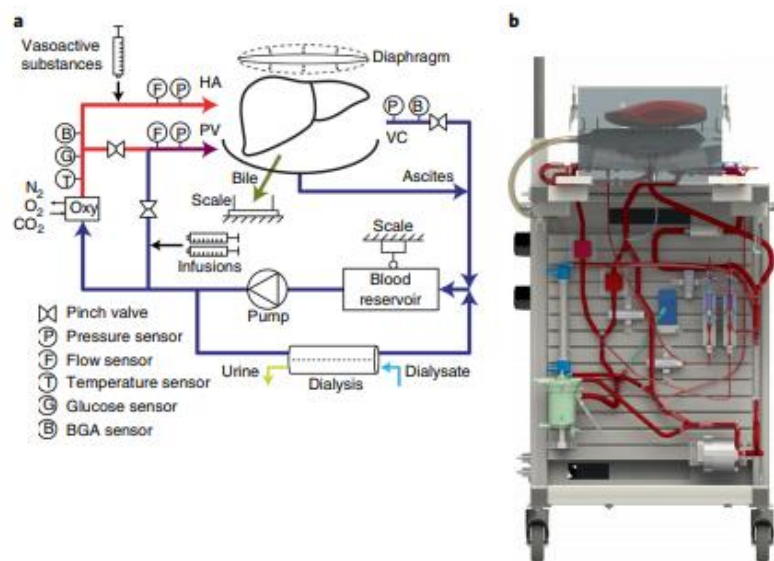


Abbildung Nr. 8: Strukturzeichnung (a) u. Foto (b) Liver4Live; Zürich, Schweiz (94)

(94). Es wurde eine Dialyse zur Kontrolle der Elektrolyte, des Hämatokrits und zur Entfernung von Stoffwechselprodukten implementiert (94). Die Leber befindet sich zur Reduktion von Druckstellen auf einer Silikonplatte, unter der ein Ballon mit einer Frequenz von 15 vertikalen Bewegungen pro min über einen Luftsoszillator aufgeblasen wird (94).

1.5.2. Beurteilung Lebervitalität

Der Transplantationserfolg wird innerhalb des klinischen Settings anhand der Patienten/-innen bzw. des Transplantatüberlebens validiert. Für die Beurteilung während des Prozesses der MP wurden zum einen zur Steuerung des Perfusionsverfahrens und zum anderen zur zuverlässigen Bestätigung der Eignung des Transplantats verschiedene Biomarker detektiert. Dabei sind neben subjektiven Markern, wie beispielsweise der makroskopischen Morphologie des Transplantats, objektive Marker von besonderem Interesse und werden in den letzten Jahren verstärkt auf ihre Zuverlässigkeit diskutiert. Die Konzentration freiwerdender Transaminasen finden einen häufigen Gebrauch als Surrogatmarker für Leberschäden in der Transplantationsmedizin im Allgemeinen, aber auch für den Prozess der MP (97). Dabei korrelieren die gemessenen Enzyme während der Perfusion mit den postoperativen Transaminasespitzenaktivitäten in den ersten sieben Tagen nach der Transplantation (97). Die am häufigsten bestimmten Marker sind die Aspartat-Aminotransferase / Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (AST / GOT) und die Alanin-Aminotransferase / Glutamat-Pyruvat-Transaminase (ALT / GPT), die bei hepatozellulärer Schädigung in den Zirkulationskreislauf freigesetzt werden (98). Die AST hat eine hohe spezifische Aktivität im Lebergewebe, kommt aber ubiquitär im ganzen Körper vor, weswegen die ALT für die Beurteilung einer Leberschädigung als spezifischer angesehen wird (98). Zwischen der produzierten Menge an Gallenflüssigkeit und der entstandenen Menge an Transaminasen konnte eine Korrelation nachgewiesen werden, weswegen die Gallenflüssigkeit als ein sehr leicht zu bewertender Biomarker für die Lebensfähigkeit der Leber während der MP verwendet werden kann (99). Darüber hinaus kann die Ausscheidung von Glukose, Bilirubin und Bikarbonat, bzw. der pH-Wert in der Gallenflüssigkeit als Funktionsmarker des Gallenabflusses dienen (97). Das Laktat als Zwischenmetabolit von Pyruvat bei der anaeroben Glykolyse kann als indirekter

Parameter einer eingeschränkten Versorgung der Leber, bzw. der Gewebhypoxie gemessen werden (100). Die Tatsache, dass die Leber das anfallende Laktat verstoffwechselt, lässt eine Funktionsbeurteilung der Leber über die Laktatclearance zu (100). Neben der Bestimmung der Transaminasen, der Gallenproduktion, sowie des Laktats und der Laktatclearance kann der Glukosestoffwechsel und die Fähigkeit der Leber, eigenständig den pH-Wert zu regulieren, ebenfalls eine wertvolle Aussage über die Leberfunktion geben (97). Eine niedrige ATP-Konzentration als Resultat einer mangelnden Sauerstoffzufuhr während der ischämischen Phase korreliert nachweislich mit schlechten Transplantationsergebnissen (101). Eine Bewertung der energetischen Erholung durch die Messung des ATP-Gehalts kann aus diesem Grund als Lebensfähigkeitsmarker während der NLP verwendet werden (101). Innerhalb des klinischen Settings sind zur Validierung der Leistungsfähigkeit ebenso leberspezifische Proteine wie das Albumin zu nennen, das bei einer hepatozellulären Syntheseinsuffizienz abfällt (98).

Derzeit gibt es eine große Anzahl an neueren Surrogatmarkern und Verfahren zur Leberbeurteilung, die bisher nur teilweise klinisch angewendet und stark diskutiert werden: Ein Beispiel dafür ist die Beurteilung der Leberschädigung über die Bestimmung nichtkodierender MicroRNAs, die wichtige Genregulatoren auf der posttranskriptionellen Ebene bilden. Es konnte in mehreren Experimenten eine signifikant erhöhte Expression der miRNA-122 bei einer IRI nachgewiesen werden (102). Eine weitere nachgewiesene miRNA mit einem hohen prädiktiven Wert für das Auftreten einer EAD ist das miRNA-146-5p (103). Eine Messung der während einer Entzündung produzierten Botenstoffgruppe der Zytokine kann ebenfalls eine Aussage über den Zustand der Leber geben: Hierbei ist insbesondere das IL-17 und IL-33 von Bedeutung (104, 105). IL-17 wird als entzündungsförderndes Zytokin von einer Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen ausgeschüttet (104). In der Studie von Li et al., die den IRI im Tiermodell untersuchte, konnte eine signifikante Steigerung des IL-17 bei vollzogener warmer Ischämie nachgewiesen werden (104). In der gleichen Studie wurde ebenso eine Erhöhung der Chemokine Eotaxin, Eotaxin-2 und des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 2 festgestellt (104). In einer durchgeführten Studie mit dem Ziel der Detektierung steatosebedingter Biomarker konnte gezeigt werden, dass ein erniedrigter IL-33 Spiegel und erhöhter Cyclin D1-Spiegel mit einer verzögerten Transplantatfunktion korrelieren

(105). Für das von der Leber sezernierte Hepatokin Fibroblast Growth Factor 21, das additiv zum Insulin die Aufnahme von Glukose in den Adipozyten reguliert, konnte ebenfalls eine Korrelation zur Schwere der IRI festgestellt werden (106). Endothelin 1 wird von vaskulären Endothelzellen gebildet und wirkt als starker Vasokonstriktor (107). In der Transplantationsmedizin scheint Endothelin 1 das Potential als Biomarker für biliäre Komplikationen zu besitzen (107).

Sowohl innerhalb des klinischen Settings bei einer Lebertransplantation, als auch in der experimentellen Chirurgie gestattet die histologische Aufarbeitung des perfundierten Lebergewebes einen besonderen Einblick in mikroskopische Morphologie und Stoffwechselaktivität (108). Neben Standardfärbeverfahren, wie der *Hämatoxylin Eosin* Färbung (H.E.), mit der ein allgemeiner Überblick gewonnen werden kann, gibt es spezielle Färbetechniken und Verfahren, wie die Immunhistochemie, mit denen spezifische Fragestellungen beantwortet werden können (109). Als wichtige Beispiele sind hier die Immunhistochemische Färbung Caspase-3 als Apoptosemarker, die Ki-67-Färbung als Proliferationsmarker und die PAS-Färbung zur Bestimmung des Glykogenhaushaltes zu nennen (109).

1.5.3. Klinische Anwendung MP

Die erste klinische Studie der maschinellen Leberperfusion wurde im Jahr 2010 durch Guarrera et al. durchgeführt (110). Die Studie umfasste den Vergleich von insgesamt 20 Transplantationen, deren Lebern zuvor einer maschinellen Perfusion von 3 bis 7 Stunden unterzogen wurden, mit kommerziell über das SCS konservierten Lebertransplantaten (110). Das verwendete Verfahren ließ sich dabei als post-static cold storage HMP definieren, da die Temperatur zwischen 4 bis 6 °C lag und der Transplantationsvorgang bis zur Ankunft im Empfängerkrankenhaus mit der SCS-Technik durchgeführt wurde (110). Insgesamt zeigte die Interventionsgruppe mit durchgeführter HMP bessere Transplantationsergebnisse: Das Auftreten einer Allotransplantat-Dysfunktion lag mit 5 % bei der HMP niedriger als in der Kontrollgruppe mit 25 % (110). Mit zwei biliären Komplikationen bei der HMP konnte das Auftreten der Allotransplantat-Dysfunktion zur Kontrollgruppe hin halbiert werden (110). Die Verletzungsmarker AST und ALT lagen im signifikant niedrigeren Bereich und die Krankenhausaufenthaltsdauer konnte ebenfalls

gesenkt werden (110). In beiden Gruppen konnten keine Fälle einer primären Funktionsstörung beobachtet werden (110). Die ein Jahr-Überlebensrate lag bei 90%, wobei der Patiententod nicht auf die Transplantatfunktion zurückgeführt wurde (110). Nach erbrachtem Beweis der Sicherheit und Durchführbarkeit ihrer MP erforschte im Jahr 2015 die Gruppe um Guarrera et al. die Verwendung von ECD-Transplantaten (111). Dazu erfolgten 31 Transplantationen mit marginalen Spenderorganen, die zuvor durch das United Network for Organ Sharing abgelehnt wurden (111). Als Vergleich wurden dazu passende ECD-Lebertransplantationen mit SCS-Konservierung herangezogen (111). Auch hier erfolgte die HMP bei 4 bis 8 °C für 3 bis 7 Stunden (111). Entsprechend der zuvor durchgeführten Studie zeigten sich bessere Transplantationsergebnisse der HMP im Vergleich zur Kontrollgruppe: Eine frühe Allotransplantat-Dysfunktion konnte von 30 % in der Kontrollgruppe auf 19 % bei der HMP gesenkt werden (111). Die Ein-Jahres-Überlebensrate lag mit 84 % ebenfalls bei der HMP höher als die der SCS-Konservierung mit 80 % (111). Auch das Auftreten von biliären Komplikationen und die Krankenhausaufenthaltsdauer waren bei der HMP signifikant niedriger (111).

Das Verfahren der HOPE fand im Jahr 2014 durch Dutkowski et al. den Einzug in die Klinik (112). Dabei konnten erfolgreich 8 DCD-Spenderorgane nach einer ein- bis zweistündigen hypothermischen Oxygenierung der Pfortader mit Perfusionslösung erfolgreich transplantiert werden (112). Die Freisetzung der Schädigungsmarker sowie die Nierenfunktion und die Krankenhausaufenthaltsdauer waren im Vergleich zur Verwendung von DBD-Lebern vergleichbar oder besser (112). Das sechsmonatige Transplantatüberleben lag bei 100 % (112). Ein Jahr später veröffentlichten Dutkowski et al. eine Studie, in der die Resultate von 25 durchgeführten und zuvor durch HOPE perfundierten Lebertransplantationen mit jeweils 50 SCS konservierten DCD- und DBD-Spenderorganen verglichen wurden (113). Dabei führte die HOPE-Behandlung von DCD-Spenderorganen im Vergleich mit den über SCS gelagerten DCD-Organen zu einer signifikanten Minderung der Organschädigung (113). Dies war ersichtlich anhand der Spitzenwerte von ALT, dem Vorhandensein einer intrahepatischen Cholangiopathie, den biliären Komplikationen und dem Ein-Jahres-Transplantatüberleben mit 90 % (113). Der Vergleich der mit HOPE perfundierten DCD-Lebern mit den durch Kühlung konservierten DBD-Organen ergab keinen signifikanten Unterschied (113).

Die erste klinische Studie zur Testung der D-HOPE Technik erfolgte im Jahr 2017 durch Van Rijn et al. (114). Dabei wurde über die Lebertransplantation von 10 Patienten/-innen mit DCD-Spenderorganen berichtet (114). In dieser Studie fand der Liver-Assist (Organ Assist, Groningen, Niederlande) Gebrauch (114). Die Ergebnisse zeigten ein 1-Jahres-Überleben von 100 % (114). Im Vergleich mit 20 DCD-SCS-Lebertransplantationen wies die D-HOPE signifikant erniedrigte Spitzenwerte von ALT und des Serumbilirubins auf (114). Die durch Patrono et al. 2018 (115) und durch Dondossola et al. 2019 (116) durchgeführten Konservierungsversuche mit der Technik der D-Hope bestätigten die Durchführbarkeit und Wirksamkeit dieser Methode bei der Transplantation von DCD- und DBD-Transplantaten.

Die erste klinische Studie der NLP wurde von der Gruppe um Ravicumar et al. 2016 publiziert (90). Sie führten zwanzig Lebertransplantationen im Jahr 2013 durch, bei denen die Lebern eine Normotherme Leberperfusion mit einer medianen Perfusionsdauer von 9,3 Stunden durchlaufen hatten und verglichen die gewonnenen Ergebnisse mit durchgeführten Lebertransplantationen, bei denen die Spenderlebern mittels statischer Kühlung konserviert wurden (90). Die Spenderorgane waren in beiden Gruppen sowohl DBD- und DCD-Lebern (90). Nach der Organentnahme und der weiteren ex vivo Präparation wurden die Lebern direkt an ein OrganOx Metra Perfusionsgerät angeschlossen (90). Das Perfusionsmedium bestand aus Erythrozytenkonzentrat, Kolloidlösung (Gelofusin), Kalziumgluconat, Heparin, Cefuroxim und Natriumbicarbonat (90). Während der NLP gab es Hinweise auf stabile hämodynamische, synthetische und metabolische Funktionen (90). Im Vergleich zu einer mit SCS konserviert durchgeführten Lebertransplantation berichtete die Gruppe um Ravicumar et al. von niedrigeren AST-Spitzenwerten bei Patienten/-innen mit durchlaufener NLP (90). Alle Patienten/-innen der Versuchsgruppe überlebten die 30 Tage und sechs Monate nach der Transplantation und 95% überleben ein Jahr (90).

In demselben und dem darauffolgenden Jahr veröffentlichten Selzner et al. (117) und Bral et al. (118) ebenfalls Studien zur NLP. Beide verwendeten ebenfalls das OrganOx Metra Gerät, sowie Erythrozytenkonzentrat innerhalb des Zirkulationskreislaufs (117, 118). Bei der Studie um Bral et al. erfolgten 10 Lebertransplantationen mit einer vorausgegangenen NLP von im Mittel 11,5 Stunden (118). Auch hier unterschieden sich sowohl die

Leberfunktion als auch das Transplantatüberleben nicht von der einer mit SCS-Konservierung durchgeführten Kontrollgruppe (118).

Die von Selzener et al. vorgenommene Studie führte 10 Lebertransplantationen mit einer Perfusionszeit von 8 Stunden durch (117). Im Vergleich zu mit SCS konservierten Lebern wiesen sie ebenfalls erniedrigte freigewordene Enzymkonzentrationen nach, jedoch ohne erreichte Signifikanz (117). Es konnte kein Unterschied in der postoperativen Transplantatfunktion und der Krankenhausaufenthaltsdauer gefunden werden (117). Anders als bei den anderen beiden Studien fand als Kolloidperfusionslösung Steen-Lösung auf der Basis von Humanalbumin Verwendung (117).

Im Jahr 2018 veröffentlichte die Gruppe um Nasralla et al. die erste multizentrische, randomisierte, kontrollierte Studie, bei der die Verfahren der NLP direkt mit denen der SCS verglichen wurden (119). Dabei wurden insgesamt 334 Spenderlebern konserviert, wobei 101 der Spenden mit vorausgehender SCS und 121 mit vorausgehender NLP über das OrganOx Metra Gerät transplantiert wurden (119). Innerhalb der Interventionsgruppe mit NLP lag der Prozentsatz der verwendeten DCD-Spenderlebern bei 37,1 % (119). Die WIT der DCD-Lebern definierte sich über die Zeitspanne zwischen einer Spenderhypoxie (Sauerstoffsättigung < 70 %) oder Hypoperfusion (systolischer Blutdruck < 50 mmHg) und den Beginn der kalten Aortaperfusion (119). Diese betrug im Durchschnitt 21 Minuten (119). Die mittlere maschinelle Perfusionszeit lag bei ca. 12 Stunden (119). Die Studie bewies eine um 50 % erniedrigte Transplantatschädigung bei der Durchführung der NLP im Vergleich zur statischen Kühllagerung, gemessen anhand der freigewordenen Enzyme, bei einer durchschnittlich um 54 % längeren Konservierungszeit (119). Der Unterschied zwischen den verwendeten DCD-Transplantaten der beiden Gruppen zeigte dabei mit 73,3 % erniedrigter Enzymfreisetzung den größten Einfluss der NLP (119). Darüber hinaus konnte die Gruppe eine geringere Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer EAD in der NLP-Gruppe um 74 % zur SCS-Gruppe nachweisen (119). Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf Gallengangskomplikationen, Krankenhausaufenthalt und Transplantatüberleben konnte nicht ermittelt werden (119). Das Ein-Jahresüberleben betrug in der NLP-Gruppe 95 % und in der SCS-Gruppe 96 % (119). Die im Jahr 2020 veröffentlichte Studie um Liu et al., bei der eine Leberperfusion über ein nicht kommerzielles Perfusionsgerät und eine auf gefrorenem Frischplasma basierende Perfusionslösung bei 21 Lebertransplantaten Anwendung fand, bestätigte die

Ergebnisse von Nasralla et al. mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von EAD bei zuvor durchgeführter NLP und einer niedrigeren Enzymfreisetzung der Leber (120). Bei dieser Studie betrug das Ein-Jahresüberleben ca. 95 % (120).

Cardini et al. berichteten im Jahr 2020 von der multidisziplinär klinisch eingeführten NLP bei marginalen Spenderorganen, logistischen Herausforderungen und komplexen Empfängern an der Universitätsklinik Innsbruck seit 2018 (121). Dabei wurden von insgesamt 34 multidisziplinären über durchschnittlich 38 Stunden durchgeführten Leberperfusionen, 25 Organe erfolgreich transplantiert (121). Das verwendete Perfusionssystem war das OrganOx Metra System (121). Nach 20 Monaten betrug das Transplantat- und Patientenüberleben 88 % (121).

Eine weitere Studie wurde im Jahr 2020 von der Schweizer Gruppe um Eshmuminov et al. publiziert (94). Diese berichteten über die Entwicklung ihres eigens konstruierten Normothermen Leberperfusionssystems Liver4Live, das für die Langzeitperfusion von bis zu einer Woche konstruiert wurde (94). Die präklinische Testung erfolgte an acht Schweinelebern, von denen drei weiter transplantiert und mit fünf durch SCS-Konservierung erhaltenen und transplantierten Lebern für drei Stunden unter Vollnarkose verglichen wurden (94). Die Leberentnahme erfolgte unter Anästhesie des Versuchstieres (94). Während der siebentägigen Perfusion zeigten die Organe erhaltene Leberfunktionen mit Gallenflüssigkeitsproduktion (94). Innerhalb der ersten zwölf Stunden war ein Anstieg von AST und 8-Hydroxydesoxyguanosin mit anschließendem Rückgang dieser Werte auffällig (94). Es konnten kein Anstieg von Cytochrom P und keine relevanten Nekrosen in der Histologie nachgewiesen werden (94). Bei den transplantierten Lebern zeigte sich kein Unterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, in Bezug auf Leberenzyme und die Histologie (94). Nach der erfolgreichen Testung des Perfusionssystems im Tiermodell gingen Eshmuminov et al. auf die klinische Anwendung ihres Perfusionssystems an menschlichen Lebern über: Dazu wurden 10 marginale Spenderlebern bei einer Temperatur von 34 °C perfundiert, wobei sechs der zehn Lebern die gewünschte Perfusionszeit von 7 Tagen erreichten (94). Leber 7 bis 10 zeigten insgesamt schlechtere Ergebnisse, wodurch der Versuch abgebrochen werden musste (94). Das verwendete Perfusat bestand aus Erythrozytenkonzentrat, gefrorenem Frischplasma, Albumin und Thrombozyten (94). Entsprechend ihren Versuchen im Tiermodell zeigte sich anfänglich an den ersten beiden

Tagen ein Anstieg der verwendeten Entzündungsmarker, die im Verlauf der Perfusion wieder sank (94). Die Leberfunktionen blieben weitgehend erhalten: So verbrauchten die Lebern durchgängig Sauerstoff, die zelluläre ATP-Synthese stieg an, es erfolgte eine Blut-Harnstoff-Stickstoff-Produktion sowie eine Laktatclearance und Aufrechterhaltung des Albuminspiegels (94). In der Histologie zeigte sich eine Abnahme der Anzahl nicht lebensfähiger Zellen und der Nachweis mitotischer Zellstrukturen (94). In steatotischen Lebern konnte eine Clearance von Fett beobachtet werden (94). Die Immunhistochemie ergab über den Nachweis des von Willebrand-Faktors, des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM1) eine intakte Endothelstruktur (94). Ein durchgeführtes PET-CT wies eine Perfusion aller Bereiche der Leber nach (94). Der pH-Wert lag zwischen 7,2 und 7,5 (94). Alle sechs bis zum Ende perfundierten Lebern zeigten eine Ammoniak-Clearance, eine Synthese von Gerinnungsfaktoren und Gallensäure mit einer effektiven Bilirubin-Clearance (94). Der Pfortaderdruck konnte bei einem Fluss von 1l/min auf < 10mmHg im physiologischen Bereich gehalten werden, ebenso die Flussrate der Leberarterie (94).

Neben der hypothermischen Maschinenkonservierung und der Normothermen Maschinenperfusion fanden klinische Studien mit einer kombinierten hypothermen und normothermen Konservierung statt: Bei einer 2016 durch Hoyer et al. durchgeführten Studie konnten sechs Lebertransplantationen mit dem Verfahren der *Kontrollierten Oxygenierten Wiedererwärmung controlled oxygenated rewarming* (COR) erfolgreich transplantiert werden (122). Dabei wurden die Organe nach einer SCS-Konservierung über 90 Minuten mit einer sauerstoffhaltigen Lösung langsam wieder erwärmt (122). Es zeigten sich erniedrigte Spitzenwerte der Enzyme und eine Transplantatüberlebensrate von 100% nach sechs Monaten (122). Dieselbe Gruppe veröffentlichte 2020 die ein-, drei- und fünf-Jahres-Überlebensdaten von 18 mit COR durchgeführten Lebertransplantationen (123). Diese lagen für das ein- und drei-jährige Überleben bei 100 % und für fünf Jahre bei 93,8 % (123). Eine weitere Studie ist die durch van Leeuwen et al. 2019 publizierte Arbeit, bei der eine kombinierte Anwendung von D-HOPE und NLP eingesetzt wurde (124). Dabei wurden 16 Spenderorgane nach einer Konservierung über SCS und D-HOPE unter normothermen Bedingungen beurteilt und 11 Lebern transplantiert mit einer sechsmonatigen Überlebensrate von 100 % (124).

1.6. Makroskopische Anatomie Schweineleber

Die Schweineleber wird in der experimentellen Chirurgie gerne als Alternative zur humanen Leber genutzt, um chirurgische Techniken zu entwickeln und wissenschaftliche Fragestellungen zu klären. Obgleich sie aufgrund ihrer vergleichbaren Morphologie in Bezug auf das Gewicht und Volumen, sowie ihrer vasalen und biliären Strukturen der menschlichen Leber ähnelt, sind bestimmte anatomische Grundlagen verschieden und für die Arbeit an und mit ihr von essenzieller Bedeutung (*Abbildung Nr. 9*): Die Schweineleber hat eine kleeblättrige Form und wiegt abhängig von Art und Alter 1,5 % bis 3 % des Körpereigengewichts und kann damit etwas leichter sein, als die humane Leber (125). Anders als die humane Leber wird sie nicht in zwei Hauptlappen geteilt, sondern durch die vier Hauptlappen rechter Seitenlappen *Lobus hepatis dexter lateralis*, linker Seitenlappen *Lobus hepatis sinister lateralis*, rechter Mittellappen *Lobus hepatis dexter medialis* und linker Mittellappen *Lobus hepatis sinister medialis* beschrieben, die durch tiefe interlobuläre Fissuren getrennt voneinander liegen (126). Entsprechend der humanen Leber kann die Schweineleber weiter in acht Segmente unterteilt werden (*Tabelle Nr. 2*) (127). Dabei wird das Segment I durch den *Processus caudatus* gebildet (127).

Die zuführenden und abführenden Gefäße der Schweineleber treten am Leberhilus ein und aus (125). Das funktionelle Gefäß der Leber zur Versorgung mit nährstoffreichem Blut ist die Pfortader (*V. portae*) (125). Sie verläuft zwischen der Leberarterie dorsal und

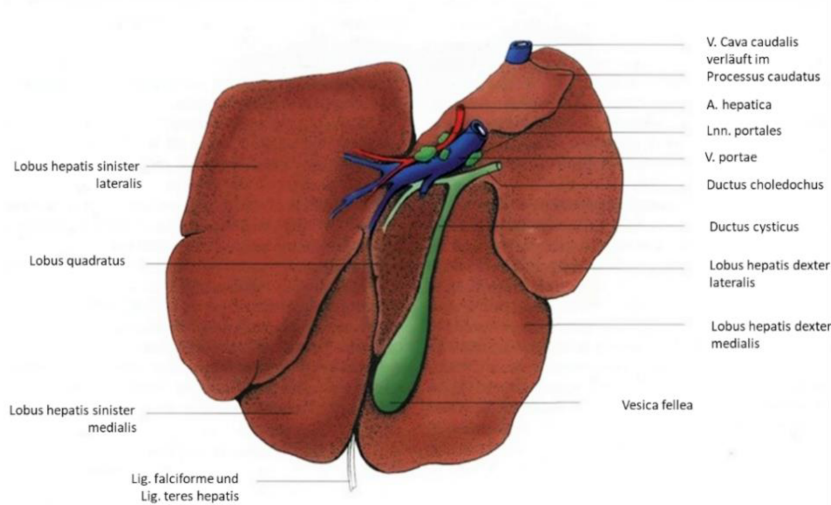


Abbildung Nr. 9: Schematische Darstellung einer Schweineleber (126)

Pfortader erfolgt entsprechend der menschlichen Leber anhand der segmentalen Gliederung (125). Eine zusätzliche Unterscheidung ist das Vorhandensein kommunizierender Äste zwischen dem rechten lateralen und rechten medialen Leberlappen der Schweineleber (125). Die Versorgung mit sauerstoffreichem Blut läuft über die A. hepatica (125). Die Leberarterie entspringt dabei dem Truncus coeliacus und teilt sich vor dem Leberhilus in einen rechten und linken Ast und folgt intraparenchymal der Aufteilung der Pfortader (125).

Der venöse Abfluss läuft anders als beim Menschen nicht über drei, sondern vier Vv. hepaticae in die V. cava inferior (125). Ein entscheidender Unterschied im venösen Abfluss liegt in der Lage der V. cava inferior zum Leberparenchym (125). Diese durchläuft beim Schwein intraparenchymal den Processus caudatus (Segment I) des rechten Seitenlappens und wird durch diesen vollständig umschlossen (125). Durch die direkte Verbindung von Hohlvene und Leberparenchym fließen die Lebervenen ebenfalls intraparenchymal zusammen (125). Der venöse Rückfluss aus Segment I erfolgt dabei direkt in die V. cava inferior (125). Darüber hinaus wird die venöse Wand als „dünnwandiger“ im Vergleich zur Menschlichen beschrieben. (125)

Die Gallengänge des linken Leberlappens münden in den Ductus hepaticus sinister, die des rechten Leberlappens einzeln in den Ductus hepaticus communis (127). Der Gallengang Ductus cysticus verläuft innerhalb einer dünnen Gewebsschicht entlang der viszeralen Oberfläche der Leber und verbindet die Gallenblase mit dem Ductus hepaticus communis zum Ductus choledochus (127).

Tabelle Nr. 2: Segmentunterteilung einer Schweineleber (127)

Leberlappen	Segmente
Lobus hepatis sinister lateralis	II und III
Lobus hepatis dexter lateralis	VI, VII und I
Lobus hepatis sinister medialis	IV
Lobus hepatis dexter medialis	V und VIII

1.7. Fragestellung und Zielsetzung

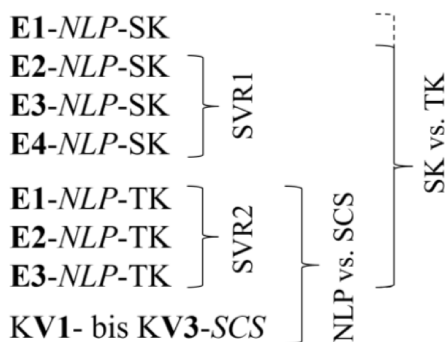
Die in der Einleitung aufgeführte hohe Diskrepanz zwischen benötigten und verfügbaren Leberspenden sowie das in den letzten Jahren neu aufgetretene Interesse an ex vivo Maschinenperfusion, sowohl für die experimentelle Forschung zur Entwicklung möglicher Therapieoptionen als auch zur Erweiterung des Pools an Spenderorganen, bildete für diese Arbeit die Indikationsgrundlage. Die Zielsetzung dieser Arbeit war dabei die Ermittlung notwendiger Elemente einer Normothermen Leberperfusion mittels der Entwicklung eines maschinellen Perfusionssystems für die experimentelle Chirurgie Tübingen, mit besonderer Problembehandlung des ischämischen Reperfusionsschadens.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Mit der Zielsetzung, die notwendigen Elemente eines Normothermen Leberperfusionssystems zu detektieren, wurde das System zwischen den einzelnen Versuchen und Versuchsreihen stetig weiterentwickelt. Aus diesem Grund beschreibt die im Folgenden aufgeführte Arbeit den Prozess der Etablierung eines Normothermen Leberperfusionssystems, durch die Durchführung immer weiter entwickelter Versuche, im Zeitraum März 2020 bis April 2022. Die Versuche ließen sich in die Versuchsreihen *Vorversuche einer Normothermen Leberperfusion im Primären Kreislauf* (VV-NLP-PK) (n = 3), das *Experiment NLP im Sekundärkreislauf* (E1-NLP-SK) (n = 1), die *Erste Standard Versuchsreihe* (SVR1) (n = 3) - bestehend aus den *Experimenten NLP im Sekundärkreislauf* (E(2-4)-NLP-SK) (n = 3), die *Zweite Standard Versuchsreihe* (SVR2) (n = 3) - mit den *Experimenten NLP im Tertiärkreislauf* (E(1-3)-NLP-TK) und *Kontrollversuche mit Statischer Kühlung* (KV(1-3)-SCS) (n = 3) unterteilen (Abbildung Nr. 10). Für jede Versuchsreihe erfolgte eine allgemeine Gliederung in Zielsetzung, Versuchsdurchführung, -ergebnis, und -analyse. Die Entwicklung des Primären Leberperfusionssystems / Primärkreislauf (PK), sowie eine allgemein gültige Versuchsbeschreibung wurde als Basis für alle Versuche aufgeführt. Mit der Grundlage der im Vorfeld durchgeführten Versuchsanalysen erfolgte zwischen der Darstellung der

VV1- bis VV3-NLP-PK



Versuche VV-NLP-PK, E(1-4)-NLP-SK und SVR2 die Beschreibung der Weiterentwicklung zum Sekundären Leberperfusionssystem / Sekundärkreislauf (SK) und Tertiären Leberperfusionssystem / Tertiärkreislauf (TK). Ein Vergleich zwischen der SVR1 und SVR2, sowie der SVR2 und den KV-SCS wurde im allgemeinen Ergebnisteil vorgenommen.

Abbildung Nr. 10: Schematische Darstellung des Studiendesigns

2.2. Spendertiere

Die Entwicklung des NLP-Systems erfolgte am Tiermodell. Das dazu in den Versuchen verwendete *ex vivo* Lebergewebe stammte von elf weiblichen deutschen Landrasseschweinen (Aktenzeichen C 12/20A). Für die Kontrollversuche wurden zusätzlich zwei Minipig-Schweine hinzugezogen (Aktenzeichen CU 1/16). Die Tierhaltung und Euthanasie erfolgten gemäß den Vorgaben des Regierungspräsidiums Tübingen und der EU-Richtlinie 2010/63/EU.

2.3. Entwicklung Primäres NLP-System

Für die Normotherme Leberperfusion wurde ein Zellreaktor (Z[®] RP GMP Breeder (Zellwerk GmbH-HiPer-Gruppe)) umfunktioniert. Dieser bot den Vorteil einer mittels UV-Licht sterilisierbaren, halbgeschlossenen Arbeitsfläche. Der Reaktor wurde über eine Kontrolleinheit (Z[®] RP Control Unit (Zellwerk GmbH-HiPer-Gruppe)) mit einem Computer verbunden. Ein geschriebenes DasyLab-Programm ermöglichte die regulierte Steuerung und Aufzeichnung von pH, Temperatur [C°], pO₂ [mmHg] und Blutdruck [mmHg]. Die Wärmezufuhr im Reaktorraum passte sich, abhängig von den gemessenen Temperaturen, automatisch an eine vorher festgelegte Solltemperatur an. Der pH wurde durch eine automatische CO₂ Zufuhr geregelt. Angetrieben über die integrierte peristaltische Pumpe des Zellreaktors (Pfortader-Kreislauf) sowie eine externe, peristaltische Pumpe (Ismatec[®] MCP-Standard) (Arterieller-Kreislauf) erfolgte eine duale, portale und arterielle Perfusion des Spenderorgans. Für die Generierung von zwei verschiedenen Blutdrücken wurde der arterielle Kreislauf über die externe Pumpe dem Pfortaderkreislauf parallelgeschaltet. Die Oxygenierung des Mediums mit einem individuell einstellbaren Gasgemisch aus Carbogen, Raumluft und b. B. CO₂ erfolgte über einen Hohlfaser-Oxygenator mit Wärmeaustauscher (Hilite 800 LT medos[®] cardiopulmonary solutions (VV-NLP-PK); MiniLungKit[®] (E1-NLP-SK; SVR1 u. SVR2)). Das Gasgemisch wurde über eine Gasaufbereitungsflasche zur Aufsättigung mit Wasser geleitet. Zur Simulation eines Peritoneums diente ein steriler Leberbeutel aus Kunststoff mit Zugängen für den arteriellen und den portalen Zufluss und dem Venen-, Beutel- und Gallenabfluss. Zum Zweck der Reduktion ischämischer Druckschäden der aufliegenden Gewebefläche lag die Leber innerhalb einer eigens dafür konstruierten

Edelstahl-Leberschale auf einem isotonen Wasserbad. Um ein bestmögliches Abfließen zu gewährleisten, wies die Leberschale Abflüsse für Vene, Leberbeutel und Gallengang nach unten auf. Es wurde ein Messturm zur direkten Messung von Temperatur, pH und pO₂-Konzentration innerhalb der Zirkulation in den Pfortaderschenkel integriert. Neben der Messung innerhalb der Zirkulation befand sich eine Temperaturmesssonde innerhalb des Reaktorraums. Durch direkte Blutdruckmesssonden im portalen und arteriellen System konnten die jeweiligen Blutdrücke direkt gemessen werden. Schaltstellen zur Probenentnahme für die Analyse der Blutgaswerte und die laborchemische Bestimmung wurden im Pfortader-Schenkel sowie im Venen- und Leberbeutelabfluss integriert (Abbildung Nr. 11 und 12).

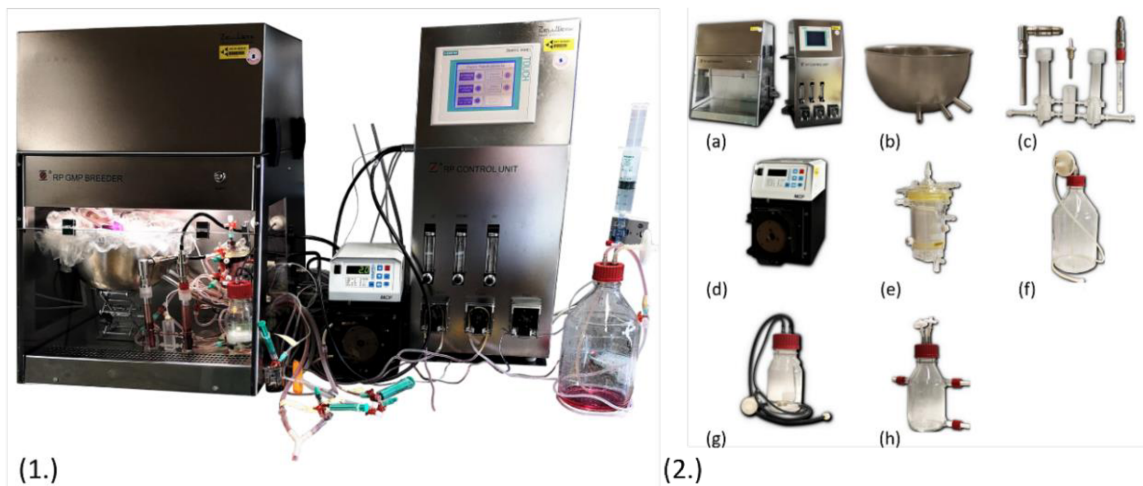


Abbildung Nr. 11: Primäres Normothermes Leberperfusionssystem: (1.) Graphische Darstellung; (2.) Versuchsmaterialien: (a) Z® RP Control Unit und Z® RP GMP Breeder (Zellwerk GmbH-HiPer-Gruppe); (b) Edelstahl-Leberschale für Leberlagerung auf isotonem Wasserbad mit Abfluss für Vene, Leberbeutel und Gallenflüssigkeit; (c) Messturm mit pO₂-, Temperatur- und pH-Sonde; (d) Externe Perfusionspumpe (Ismatec® MCP Standard); (e) Hilite 800 LT Hohlfaser Oxygenator mit Wärmeaustauscher (medos® cardiopulmonary solutions); (f) Feed- / Basenflasche mit Luftfilter (Porengröße 0,2 µm); (g) Gasaufbereitungsflasche; (h) Reservoirflasche mit Luftfilter (Porengröße 0,2 µm)

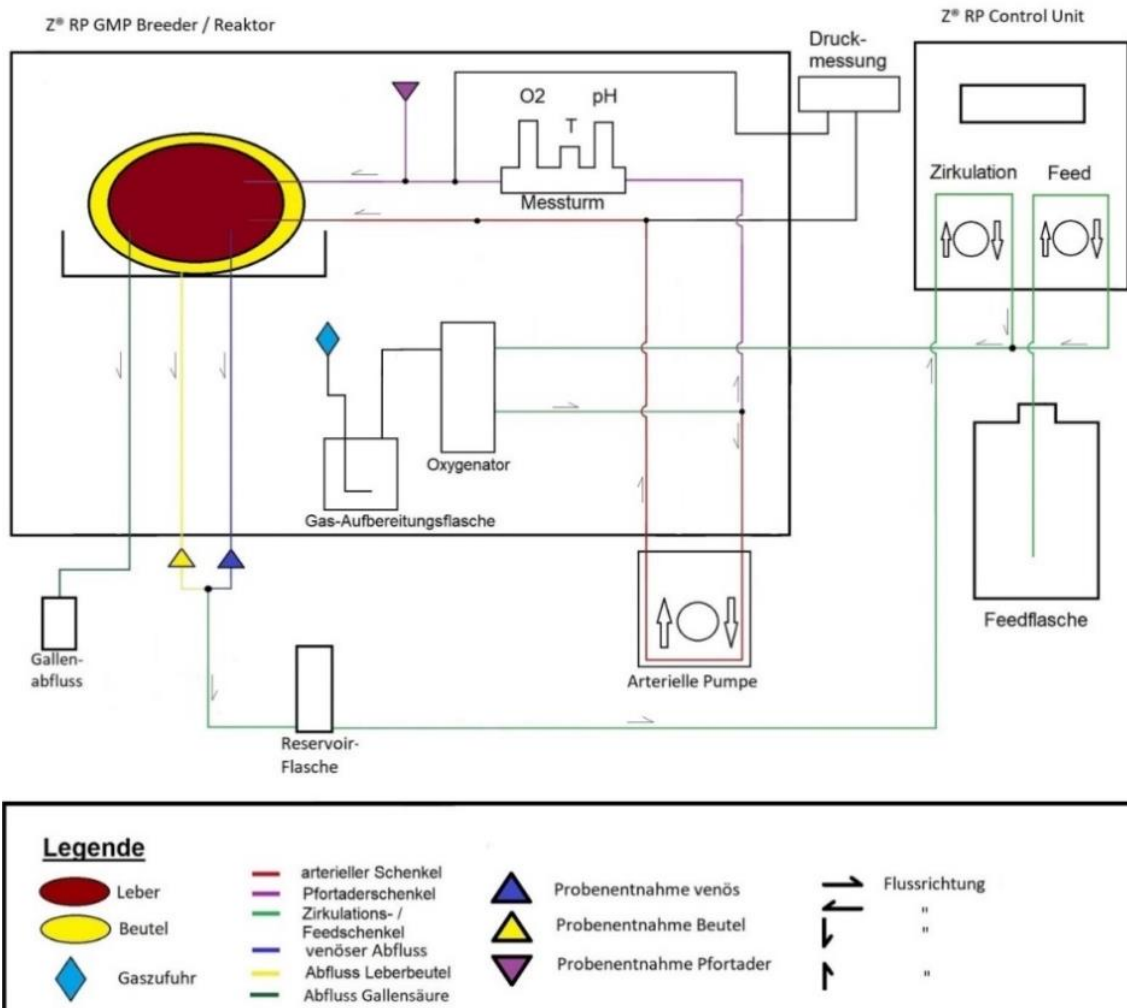


Abbildung Nr. 12: Strukturzeichnung Primäres Leberperfusionssystem

2.4. Basis Versuchsdurchführung:

2.4.1. Basis Hepatektomie

Die chirurgische Hepatektomie erfolgte unter sterilen Bedingungen innerhalb eines Operationssaals. Eine sterile Abdeckung sowie die Desinfektion des Operationsgebietes mit Braunol®-Lösung 7,5% sicherte ein keimfreies Arbeiten. Das Spendertier erhielt 50.000 I.E. Heparin. Die medikamentöse Euthanasie lief unter Sedierung mit T61® (VV-

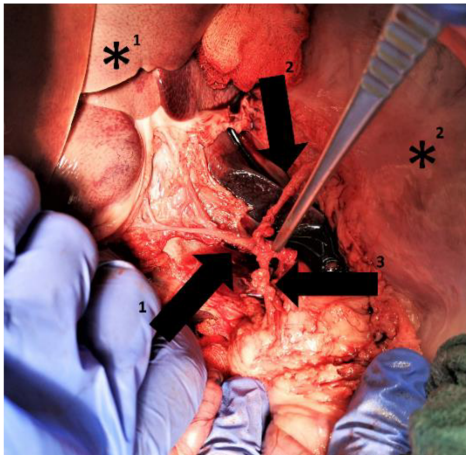


Abbildung Nr. 13: Hepatektomie Präparation: (*¹) Leber; (*²) Gaster; (Pfeil 1) A. hepatica mit Aufzweigung in A. hepatica dextra et. sinistra; (Pfeil 2) Abzweigung A. gastrica dextra; (Pfeil 3) A. gastroduodenalis

NLP-PK u. E1-NLP-SK) oder Pentobarbital® (SVR1, SVR2 u. KV-SCS) ab. Die Operation begann mit der Feststellung des kardialen Todes des Spendertiers. Nach einer Laparotomie und Eröffnung des Peritoneums parietale folgte die intraabdominelle Darstellung und Präparation der supra- und infrahepatischen Anteile der V. cava inferior sowie der V. portae, der A. hepatica und des Ductus choledochus im Ligamentum hepatoduodenale (Abbildung Nr. 13). Eine weit distal des Leberhilus vorgenommene Katheterisierung der A. hepatica sicherte ein

möglichst großes Gefäßlumen für eine optimale Perfusion sowie die arterielle Versorgung von A. hepatica sinistra et. dextra und A. cystica. Abzweigungen sowie Gefäßkollateralen der A. hepatica wurden ligiert. Durch die Verwendung verschiedener Kanülen konnten die jeweiligen Gefäße katheterisiert werden (Abbildung. Nr. 27). Die Katheterisierung der V. cava inferior erfolgte über den infrahepatisch liegenden Teil der Hohlvene mit dem Resultat eines intracavalen retrograden Flusses entlang der Schwerkraft. Der oberhalb des Processus caudatus liegende Teil wurde ligiert. Der abschließende Operationsschritt befasste sich mit der Trennung des Ligamentum hepatoduodenale distal der katheterisierten Gefäße, sowie der Lösung aller Verwachsungen der Spenderleber mit dem Abdomen und Diaphragma. Nach der Präparation der Spenderleber im Leberbeutel konnte mit der Normothermen Leberperfusion im Labor begonnen werden.

2.4.2. Basis Perfusionsmedium

Parallel zur Entwicklung des Perfusionssystems erfolgte eine Veränderung des verwendeten Perfusionsmediums. Allen Versuchen gleich (außer VV1-NLP-PK) war die Verwendung von Erythrozyten als Sauerstoffträger. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen ein Erythrozytenkonzentrat hergestellt: Aus deutschen Landrasseschweinen gewonnenes Vollblut erhielt zur Antikoagulation 15.000 I.E./L Heparin. Nach Zentrifugation mit 3000 G über 15 min und anschließendem Absaugen von Bluts Serum und „Buffy-Coat“ lag das Erythrozytenkonzentrat vor. Die Lagerung bei 5°C und das Hinzufügen von 0,2 ml/ml SAGM-Lösung diente einer besseren

Tabelle Nr. 3: Herstellung SAGM-Lösung in 100 ml Ampuwa®

	Menge [g]
D-Glucose	0,900
Natriumchlorid	0,877
Adenin	0,0169
Mannitol	0,525

Konservierung (Tabelle Nr. 3). Neben dem Erythrozytenkonzentrat erhielt das Perfusionsmedium unterschiedliche, in den jeweiligen Versuchsdurchführungen klassifizierte Lösungen sowie Medikamente (Tabelle Nr. 4).

2.4.3. Basis Durchführung Normotherme Leberperfusion

Die Sterilität des Perfusionssystems konnte durch eine Desinfektion mit Ethanol 70 % und anschließender UV-Sterilisation des Reaktorraumes sowie durch einen sterilen Versuchsaufbau mit zuvor autoklavierten Versuchsmaterialien sichergestellt werden. Die Kalibrierung der Perfusionspumpen, der pH- und pO₂-Sonden erfolgte anhand der Angaben des Herstellers. Die vordefinierten Temperaturgrenzen einer Normothermen Leberperfusion lagen zwischen 35 und 38 °C. Der Blutdruck der V. portae, sowie der Blutdruck der A. hepatica, sollten im physiologischen Bereich von 5 bis 15 mmHg (akzeptabler Bereich 0 bis 20 mmHg) und 60 bis 120 mmHg (akzeptabler Bereich 60 bis 160 mmHg) gehalten werden.

2.4.4. Basis Medikation

Zur Prophylaxe einer Kontamination erhielt das Perfusionsmedium eine Standard-antimikrobielle-Medikation (SAM) aus Antibiotika und Antimykotika (Tabelle Nr.4).

Darüber hinaus wurde während der Versuchsdurchführung eine Dauermedikation mit Heparin zur Antikoagulation, sowie mit Insulin zur Förderung der Glykolyse, verabreicht. Individuell konnte bei einer entstehenden Azidose zur Pufferung Natriumhydrogencarbonat, bei einer Hypoglykämie Glucose und bei einer Hypokalziämie Kalziumchlorid verabreicht werden.

Tabelle Nr. 4: Standard-antimikrobielle-Medikation (SAM): (a) mit Penicillin-Streptomycin; (b) mit Ceftriaxon

	Penicillin-Streptomycin^a	Gentamycin	Amphotericin B
	bzw.		
	Ceftriaxon^b		
Standard-antimikrobielle-Medikation c [1/L]	100 U Pen. / 100 mg Strep. bzw. 100 mg Ceftriaxon	100 mg	2500 µg

2.4.5. Basis Datenerhebung

Zur genaueren Vergleichbarkeit der Versuche untereinander wurde die ischämische Zeitspanne [h] während der Hepatektomie gemessen und im Anschluss das Gewicht [kg] der Leber bestimmt. Die Leberperfusionszeit (LP-Zeit) definierte sich über den Start der Perfusion innerhalb des Labors und endete mit dem Stopp der Aufzeichnung. Essenziell für die Normotherme Leberperfusion war die Bestimmung des Drucks [mmHg] in Pfortader und A. hepatica, sowie der Temperatur [°C] innerhalb des Reaktors und der Zirkulation. Die Messung von pH und pO₂ innerhalb der Pfortader diente einer besseren Verlaufskontrolle und der automatischen Systemregulation. Proben konnten aus Pfortader, Vene und Leberbeutel entnommen und direkt im Labor über ein BGA-Messgerät (Radiometer ABL 800 Flex®) analysiert werden. Darüber hinaus erfolgte eine venöse Entnahme von Proben für eine spätere laborchemische Analyse. Die Lagerung der Proben bei -50 °C diente der Konservierung der zu bestimmenden Proteinstrukturen. Für die laborchemische Analyse der VV-NLP-PK und von E1-NLP-SK wurde im Anschluss an die Normotherme Leberperfusion eine photometrische Konzentrationsbestimmung des Enzyms Asparat-Aminotransferase (AST/GOT) und der Eiweiße Albumin und Harnstoff mit Reagenzien der Firma Diagnostic-Systems GmbH durchgeführt. Eine Dreifachbestimmung über je drei Verdünnungsreihen ermöglichte eine genaue Konzentrationsbestimmung. Die Laboranalyse der SVR1, SVR2 und KV-SCS erfolgte

während der Versuchsdurchführung im Zentrallabor Universitätsklinikum Tübingen. Dabei beinhaltete die Laboranalyse die Bestimmung der Konzentrationen der Enzyme Asparat-Aminotransferase (AST/GOT), Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT), der Proteine Albumin und Harnstoff, sowie die Analyse der Konzentrationen von Erythrozyten, Hämatokrit, Leukozyten und Thrombozyten. Die Gewinnung von histologischen Proben ermöglichte eine mikroskopische Analyse des Lebergewebes. Die in Formaldehyd 10 % fixierten Proben wurden in der Pathologie Universitätsklinikum Tübingen eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin Eosin (H.E.) gefärbt. Eine mögliche Kontamination konnte durch eine Probenentnahme und anschließende Kultivierung bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 h ausgeschlossen werden.

2.5. Vorversuche Normotherme Leberperfusion Primärkreislauf (VV-NLP-PK)

2.5.1. Zielsetzung

Mit dem Ziel der Etablierung eines Normothermen Leberperfusionssystems mit der Fähigkeit einer Langzeitperfusion wurden drei Vorversuche durchgeführt. Zielsetzung des ersten Versuches VV1-NLP-PK war die Testung des Primären Systems mit der Fragestellung der System-Stabilität. Die Durchführung von VV2- und VV3-NLP-PK diente der Aufdeckung von Problemen während der Leberperfusion zum Zweck der Weiterentwicklung des Systems.

2.5.2. Versuchsdurchführung

Versuchsaufbau und -durchführung entsprachen dem Primären Normothermen Leberperfusionssystem (*Abbildung Nr. 11 und 12*) bzw. der Basis Versuchsdurchführung. Das Perfusionsmedium der Vorversuche bestand aus einem Gemisch aus Erythrozytenkonzentrat und William's E Medium®. Das Mischverhältnis berechnete sich anhand einer Hämoglobinkonzentrationsbestimmung, wobei aufgrund der gleichzeitigen Perfusion von A. hepatica und V. portae die Zielkonzentration auf 3-6 g/dl gesetzt wurde, um die Gefahr einer Hyperoxie in der V. portae zu verringern. Das Perfusionsmedium erhielt die SAM^a (*Tabelle Nr. 4*), sowie in den Versuchen VV2- und VV3-NLP-PK Heparin, Insulin und Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA), eine natürlich vorkommende Gallensäure zur Verbesserung des Gallenabflusses. Da VV1-NLP-PK als Zielsetzung

lediglich die Beurteilung der Systemstabilität beinhaltete, konnte auf einen Sauerstoffträger im Perfusionsmedium verzichtet werden. Für die, während der Hepatektomie durchgeführte Katheterisierung der V. portae und der V. cava inferior wurden Nelaton-Katheter® (ø 4,67 mm) und für die A. hepatica und den Ductus choledochus Venenverweilkatheter (Vasofix®Safety 24G; B|Braun®) (ø = 1,3 mm) verwendet. Im Anschluss an die Hepatektomie startete direkt die Normotherme Leberperfusion. Die Hinzugabe von Carbogengas über den Oxygenator resultierte in einer angestrebten leichten Hyperoxie. Es erfolgten stündliche BGA-Messungen aus Pfortader und Vene sowie dreistündliche BGA-Messungen aus dem Beutelabfluss. Der Zeitrahmen für die venöse Probenentnahme zur Laboranalyse wurde auf eine Entnahme alle drei Stunden und der für die Gewinnung von histologischen Proben auf alle vierundzwanzig Stunden gesetzt. Bei VV1-NLP-PK ist ausschließlich eine Messung der Blutgaskonzentration ohne zeitliche Vorgaben aus dem venösen Abfluss erfolgt.

2.5.3. Versuchsergebnisse

Es wurden drei normotherme Leberperfusionen durchgeführt. Die Spenderlebern stammten von weiblichen deutschen Landrasseschweinen ($1,98 \pm 0,56$ kg). Es erfolgte in allen Versuchen eine regelrechte Hepatektomie nach den oben aufgeführten Angaben, wobei die erste durchgeführte Operation mit 3,2 Stunden mehr als die doppelte Zeit in Anspruch nahm. Damit betrug die durchschnittliche warme ischämische Zeitspanne $1,91 \pm 1,12$ h (*Tabelle Nr. 5*).

Tabelle Nr. 5: Basisdaten VV-NLP-PK; (*Leberperfusionszeit)

Versuch	Gewicht [kg]	OP-Zeit [h]	LP-Zeit* [h]
VV1-NLP-PK	2,13	3,2	3,82
VV2-NLP-PK	2,45	1,18	58,08
VV3-NLP-PK	1,36	1,35	20,95

Vorversuch 1 Normotherme Leberperfusion Primärkreislauf

Die Perfusionszeit von VV1-NLP-PK betrug 3 Stunden 49 min. Die Temperatur innerhalb des Reaktors konnte auf $36,46 \pm 0,92$ °C und innerhalb des Zirkulationskreislaufs auf $30,95 \pm 1,29$ °C gehalten werden. Der Druck der Pfortader lag

bei $-0,07 \pm 10,44$ mmHg und der der A. hepatica bei $62,13 \pm 94,38$ mmHg. Es zeigte sich bereits zu Beginn der Perfusion ein pH-Wert im venösen Abfluss von 6,44, welcher nach 2,6 Stunden unterhalb des messbaren Bereichs fiel. Parallel dazu stieg das Kalium von initial 10,2 mmol/l auf eine Konzentration von 14,4 mmol/l. Die Konzentration von Kalzium innerhalb der Vene lag im Mittel bei $0,35 \pm 0,03$ mmol/l, die von Natrium bei $138,83 \pm 3,82$ mmol/l, die von Chlorid bei $127,67 \pm 4,55$ mmol/l und die von Glucose bei $4,15 \pm 0,29$ mmol/l. Makroskopisch zeigte sich die Leber cholestatisch, verhärtet und hypertroph mit einer massiven Venenstauung. Während der Perfusion produzierte die Leber keine Gallenflüssigkeit.

Vorversuch 2 Normotherme Leberperfusion Primärkreislauf

Bei VV2-NLP-PK wurde eine Perfusionszeit von 58,08 h erreicht. Die ischämische Zeitspanne während der Hepatektomie konnte auf 1,18 h reduziert werden. Die Temperatur innerhalb des Reaktors lag im Durchschnitt bei $38,02 \pm 2,03$ °C und innerhalb der Zirkulation bei $33,17 \pm 1,73$ °C. Der Pfortaderdruck konnte bei $10,97 \pm 25,34$ mmHg und der arterielle Druck bei $123,97 \pm 97,17$ mmHg gehalten werden. Während des Versuches zeigte sich eine massive Azidose trotz der Hinzugabe von 0,12 mol Natriumhydrogencarbonat. So lag der pH-Wert in der Pfortader bei $7,17 \pm 0,21$ und innerhalb der Vene bei $6,90 \pm 0,38$. Intermittierend sank der pH-Wert unterhalb eines messbaren Bereichs von 6,32. Es zeigte sich initial ein starker Anstieg der Hämoglobinkonzentration innerhalb der Vene von 0,09 g/dl auf 3,2 g/dl. Anschließend konnte ein starker Abfall der Hämoglobinkonzentration in allen Gefäßen und dem Leberbeutel gemessen werden. Eine während des Versuchsverlaufes durchgeführte Problemanalyse ergab eine stark erhöhte Konzentration von Erythrozyten innerhalb der Reservoirflasche, ausgelöst durch ein erhöhtes Niveau des aus der Flasche führenden Abflussschlauches. Nach einer Umstellung des Versuchsaufbaus stieg die Hämoglobinkonzentration ohne Zugabe von Erythrozytenkonzentrat wieder an. Des Weiteren verbesserte sich die Hämoglobinkonzentration und der pH-Wert. Während des Versuches wurden dem Versuchsmedium insgesamt 380 ml Erythrozytenkonzentrat hinzugegeben. Die Gabe an zugeführtem Heparin belief sich neben zwischenzeitigen Boli von insgesamt 5500 I.E. auf 1500 I.E. / 3 h. Die eingestellte Sauerstoffkonzentration

innerhalb der Pfortader lag bei $318,66 \pm 114,83$ mmHg. Zu Beginn zeigte sich ein sehr hoher ungedeckter Sauerstoffbedarf der Leber, welcher sich erst nach ca. 24 Stunden legte. Die gemessene Glucosekonzentration innerhalb des Systems spiegelte den Energiebedarf und die durch den zu Beginn vorliegenden Sauerstoffträgermangel notwendige anaerobe Glycolyse der Leber wider. So fiel diese von einer anfänglichen Konzentration mit $8,6$ mmol/l in der Pfortader auf Werte bis zu 0 mmol/l. Die Konzentrationserhöhung zum Ende des Versuches steht in Korrelation mit einer Zugabe von 10 ml 20% Glucose-Lösung. Die für eine Förderung der Glycolyse zugeführte Konzentration an Insulin belief sich auf 12 I.E./3h mit einer zusätzlichen Gabe von 5 I.E. zu Beginn der Perfusion. Die Kaliumkonzentration stieg innerhalb der ersten $7,62$ Stunden von einem venös initial gemessenen Wert von $14,8$ mmol/l, über 25 mmol/l, in einen nicht messbaren Bereich. Das Blutkalzium sank von einer zu Beginn gemessenen Konzentration von $1,03$ mmol/l auf einen Wert von $0,32$ mmol/l. Im Durchschnitt lag es bei $0,38 \pm 0,16$ mmol/l und damit deutlich unterhalb des physiologischen Normbereichs. Innerhalb der Pfortader und Vene zeigte sich eine Hyponatriämie mit $125,71 \pm 10,18$ mmol/l in der Pfortader und $120,45 \pm 9,91$ mmol/l in der Vene, die erst zum Ende des Versuches im Normbereich zu liegen kam. Chlorid konnte weitgehend im

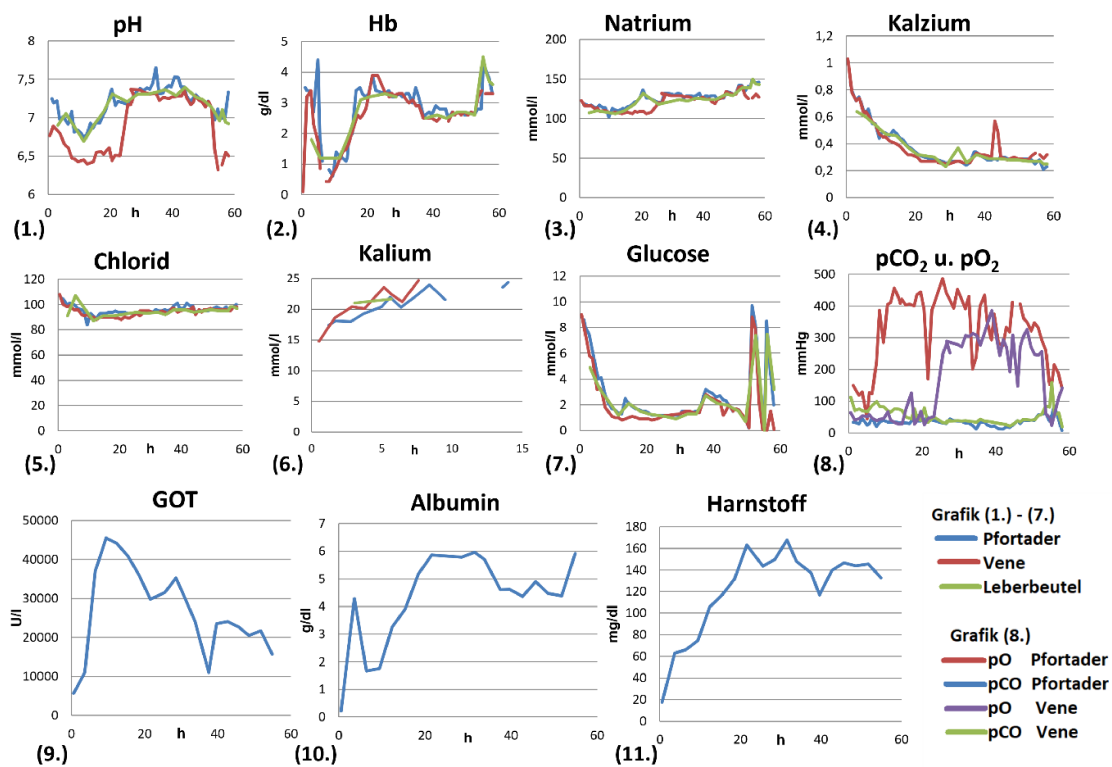


Abbildung Nr. 14: Blutgasanalyse und Laborauswertung VV2-NLP-PK

physiologischen Normbereich in der Pfortader bei $95,90 \pm 3,38$ mmol/l und in der Vene bei $94,14 \pm 3,63$ mmol/l gehalten werden. Die Ermittlung der nach dem Versuch durchgeführten Laboranalyse von Albumin ergab eine steigende Konzentration innerhalb des Perfusionszeitraums. Dabei lag dieser durchschnittlich bei einer Konzentration von $4,35 \pm 1,62$ g/dl. Es konnte eine erhöhte Konzentration an Harnstoff während des Versuches mit $121,52 \pm 39,47$ mg/dl nachgewiesen werden. Die starke Erhöhung der Aktivität von GOT auf einen Maximalwert von 45538 U/l spiegelte die starke Zellschädigung innerhalb der Leber wider. Nach Erreichung des Maximalwertes fiel die GOT-Aktivität wieder kontinuierlich ab (*Abbildung Nr. 14*).

Makroskopisch zeigte sich die Leber in diesem Versuch weich und heterogen aufberginefarben. Während der Perfusion produzierte sie insgesamt 10 ml Gallenflüssigkeit bei einer Gabe von 7 μ m TUDCA. Der Versuch wurde nach 58,08 Stunden aufgrund einer Leckage in der Pfortader und einer daraus resultierenden fehlenden Leberzirkulation abgebrochen. In der makroskopisch pathologischen Präparation konnten massive thrombotische Gefäßverschlüsse durch im Zirkulationsmedium befindliche Zelltrümmer und Gewebe nachgewiesen werden. Diese multiplen Gefäßverschlüsse hatten eine massive Stauung der Pfortader zur Folge, mit Maximaldrücken von 595,35 mmHg, woraufhin das Gefäß rupturierte. Die histologische Gewebsanalyse unter dem Mikroskop zeigte ein sehr heterogenes Bild mit großen ischämischen zellkernfreien Arealen, sowie zellkernreiche Bereiche. Die Hepatozyten zeigten sich überwiegend atroph mit erweiterten Sinusoiden (*Abbildung Nr. 15*).

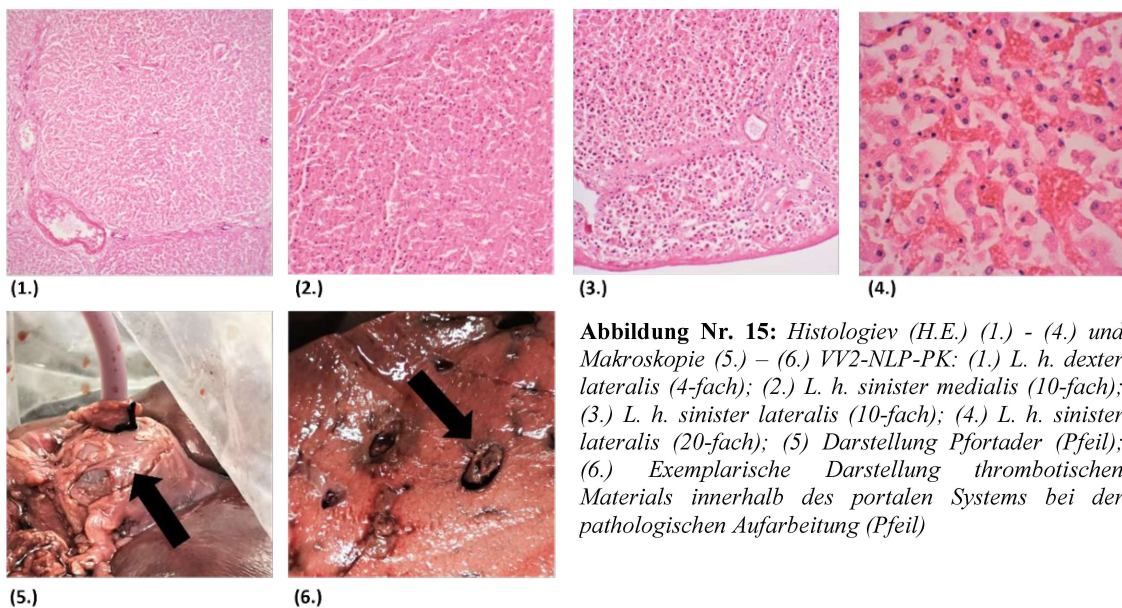


Abbildung Nr. 15: Histologie (H.E.) (1.) - (4.) und Makroskopie (5.) - (6.) VV2-NLP-PK: (1.) L. h. dexter lateralis (4-fach); (2.) L. h. sinister medialis (10-fach); (3.) L. h. sinister lateralis (10-fach); (4.) L. h. sinister lateralis (20-fach); (5.) Darstellung Pfortader (Pfeil); (6.) Exemplarische Darstellung thrombotischer Materialien innerhalb des portalen Systems bei der pathologischen Aufarbeitung (Pfeil)

Vorversuch 3 Normotherme Leberperfusion Primärkreislauf

Die Perfusionsdauer von VV3-NLP-PK belief sich auf 20,95 h. Die Dauer der Ischämie während der Hepatektomie betrug 1,35 h. Es wurde eine durchschnittliche Temperatur von $38,31 \pm 0,92$ °C innerhalb des Reaktors und $32,81 \pm 0,85$ °C innerhalb der Zirkulation gemessen. Der Druck in der Pfortader lag im Durchschnitt bei $3,29 \pm 16,05$ mmHg und der der A. hepatica bei $40,66 \pm 44,26$ mmHg. Die Berechnung des pH-Wertes ergab einen durchschnittlichen pH-Wert in der Pfortader von $7,26 \pm 0,22$ und in der V. cava inferior von $6,77 \pm 0,18$. Dabei zeigte sich in beiden Gefäßen und im Leberbeutel ein abfallender Trend, sodass das Perfusionsmedium im Versuchsverlauf, trotz einer Hinzugabe von 0,217 mol Natriumhydrogencarbonat, eine starke Azidose aufwies. Weiterhin auffällig war eine hohe Differenz zwischen Werten der Pfortader und Werten der Vene. Ähnlich wie bei VV2-NLP-PK zeigte sich bei einer initial hohem Hämoglobinkonzentration von 6,6 g/dl in der Pfortader ein starker Abfall der gemessenen Konzentration bis zu einem Wert von 1,3 g/dl. Im Durchschnitt lag die Hämoglobinkonzentration in der Pfortader bei $3,77 \pm 1,72$ g/dl. Der Hämoglobinkonzentrationsabfall ließ sich parallel zur Pfortader ebenso in der Vene beobachten, wobei dieser im Durchschnitt mit einem Wert von

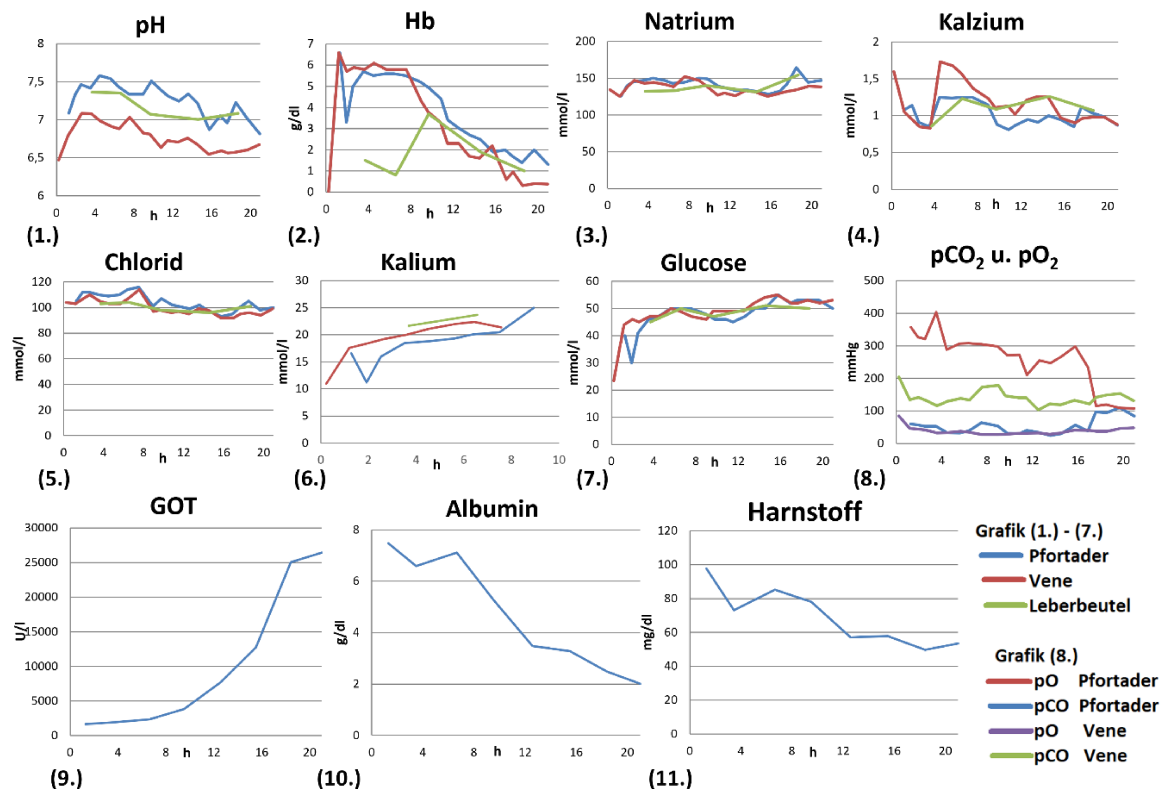


Abbildung Nr. 16: Blutgasanalyse und Laborauswertung VV3-NLP-PK

3,26 ± 2,34 g/dl tiefer lag. Es wurde insgesamt eine Menge von 360 ml Erythrozytenkonzentrat zugeführt. Die zugeführte Menge an Heparin belief sich auf 2.000 I.E./3h mit einer zusätzlichen Bolusgabe von 2.500 I.E. Der pO₂-Wert in der Pfortader konnte bei 258,19 ± 83,09 mmHg gehalten werden und wies nach der Leberpassage einen Wert von 38,57 ± 12,11 mmHg auf. Es zeigte sich eine starke Hyperkapnie im venösen Gefäß von 140,41 ± 22,21 mmHg. Die Mineralstoffe Natrium mit 141,52 ± 8,99 mmol/l, Kalzium mit 1,02 ± 0,15 mmol/l und Chlorid mit 104,19 ± 6,52 mmol/l, gemessen innerhalb der Pfortader, konnten weitgehend im physiologischen Bereich gehalten werden. Dabei wurden zum Erhalt der Kalziumkonzentration 10 mmol Kalziumchlorid während des Versuches zugeführt. Die Konzentration von Kalium stieg innerhalb der ersten 8 bis 10 Stunden stark über einen nicht messbaren Bereich an. Die Glucose lag in der Pfortader durchschnittlich bei einer Konzentration von 47,71 ± 5,58 mmol/l. Es wurden 8 I.E./3h und 2 Boli mit 16 I.E. Insulin dem Zirkulationskreislauf zugeführt. Die Laboranalyse ergab einen starken Anstieg von GOT auf eine Aktivität von 26436,62 U/l und eine abfallende Albumin-Konzentration von initial 7,47 mg/dl auf 2,01 mg/dl. Der Harnstoff lag zu Beginn des Versuches mit 97,8 mg/dl im stark erhöhten Bereich, fiel jedoch im Verlauf auf eine durchschnittliche Konzentration von 69,06 ± 17,23 mg/dl (*Abbildung Nr. 16*). Die Leber produzierte keine Gallenflüssigkeit, trotz einer Hinzugabe von insgesamt 4 µm TUDCA-Lösung. Makroskopisch stellte sie sich zum Versuchsende stark geschwollen, verhärtet, auberginenfarben mit Cholestasezeichen dar. In der pathologischen Aufarbeitung zeigte sich eine intravasale Gasblasenbildung.

2.5.4. Versuchsanalyse Vorversuche

Mit Vorversuch VV1-NLP-PK konnte die Realisierbarkeit eines stabilen normothermen Kreislaufs mit einer dualen Perfusion und zwei unterschiedlichen Drücken bewiesen werden. Durch die Nichtverwendung eines Sauerstofftransportsystems im Medium zeigte sich jedoch sehr schnell eine Schädigung des Leberparenchyms. Diese konnte durch die Veränderung der makroskopischen Lebermorphologie mitsamt Leberstauungsbild durch den steigenden Kaliumspiegel und einen fallenden pH-Wert als Indizien einer Zellschädigung des Leberparenchyms nachgewiesen werden.

Der Vorversuch VV2-NLP-PK bestätigte die Durchführbarkeit einer im System stabilen Normothermen Leberperfusion im Langzeitversuch. Durch die Verwendung von Sauerstoffträgern im Medium zeigte sich das Leberparenchym mikroskopisch teilweise intakt, jedoch waren große Bereiche ebenfalls ischämisch ohne erkennbaren Zellkern. Darüber hinaus konnte zu Beginn ein sehr starker Anstieg der Aspartat-Aminotransferase festgestellt werden. Die starke Zellschädigung innerhalb der ersten 24 Stunden wurde auf die mangelnde Konzentration an Erythrozyten bzw. Hämoglobin zurückgeführt. Der Abbruch der Perfusion im Labor, bedingt durch die portale Hypertension bzw. die Leckage in der V. portae ließ sich durch die mechanische Ursache eines thromboembolischen Ereignisses, ausgelöst durch Zell- und Parenchymreste des Lebergewebes, innerhalb des portalen Systems erklären.

Der Nachweis von Gasblasen im Gefäßsystem, während der pathologischen Parenchymanalyse nach Beendigung des Versuches VV3-NLP-PK sowie der mangelnde venöse Rückfluss während des Versuches lassen auf ein anterogrades oder retrogrades Eindringen von Luftthromben über den venösen Rückfluss schließen, da das Lebergewebe den höchsten Punkt innerhalb des Perfusionssystems darstellte.

In allen durchgeführten Versuchen zeigte sich eine Problematik der Perfusion von A. hepatica, sowie des Gallenabflusses über eine Venenverweilkanüle durch ein Abknicken der Kanüle. Darüber hinaus wurde eine schlechte Regulation der Mineralstoffe und des pH-Wertes sowie eine erhöhte Konzentration an Harnstoff ersichtlich.

2.6. Entwicklung sekundäres NLP-System

2.6.1. Physiologische Bewegung der Leber

Die Leber ist sowohl im menschlichen als auch im tierischen Körper einer ständigen Bewegung ausgesetzt. Indem sich der Körper bewegt, dreht und umlagert, erfährt die Leber eine gleichmäßige Gewichtsverteilung, wodurch periphere, dem Lebereigengewicht unterliegende und schlechter perfundierte Gewebeareale entlastet werden. Auch Bewegungen innerhalb des Körpers, ausgelöst durch peristaltische Bewegungen und Atmung, nehmen einen Einfluss darauf. Da nicht nur das Lebergewebe über bindegewebige Verwachsungen, sondern auch die V. cava inferior anatomisch direkt mit dem Zwerchfell verbunden ist, hat die Bewegung des Zwerchfells im Schweinemodell auf die Hämodynamik einen großen Einfluss und diente in dieser Versuchsreihe als Ansatzpunkt zur Etablierung einer physiologischen Bewegung. Ziel der physiologischen Leberbewegung in dieser Versuchsreihe war eine vertikale kontinuierliche Leberbewegung mit einer einstellbaren Frequenz über das Zwerchfell. Essenzieller Bestandteil war der Erhalt der mit der Leber verwachsenen Anteile des Zwerchfells. Eine konstruierte Plattform, bestehend aus einer stabilen Edelstahlplatte, deren Unterseite mit Schaumstoffgewebe zur Gewebeauflage verbunden war und ein gleichmäßig gewichtsverteiltes und rotierbares Zugseil zur Oberseite aufwies, diente als Verbindungsstück zwischen Diaphragma und Bewegungssystem. Die Unterseite konnte für einen gleichmäßigen und sicheren Halt mit Ethyl-2-Cyanacrylat und chirurgischen Nähten (Perma-Hand™ SILK; Ethicon®) mit dem Bindegewebe des Zwerchfells verbunden werden. Eine Autoklavierung unterschiedlicher Größen und Formen der Plattform sicherte ein steriles Arbeiten und eine optimal passende Kraftübertragung über

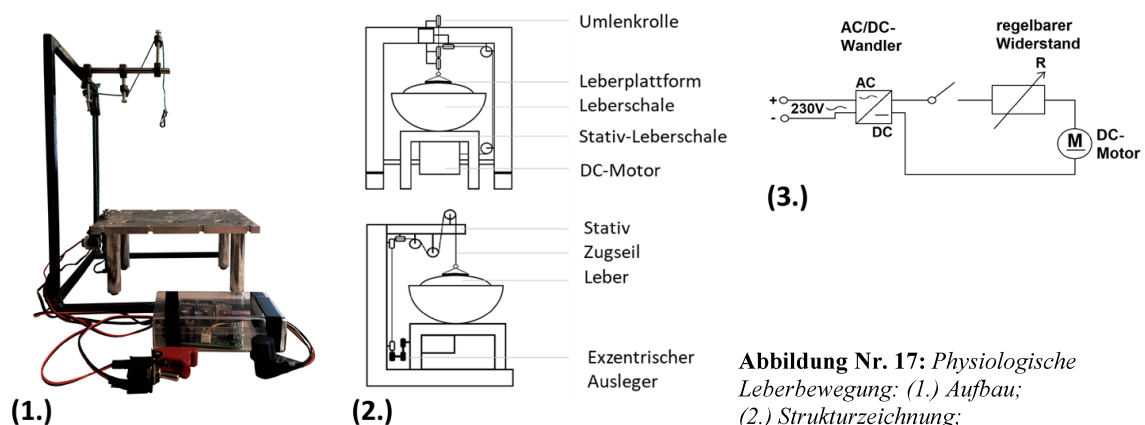
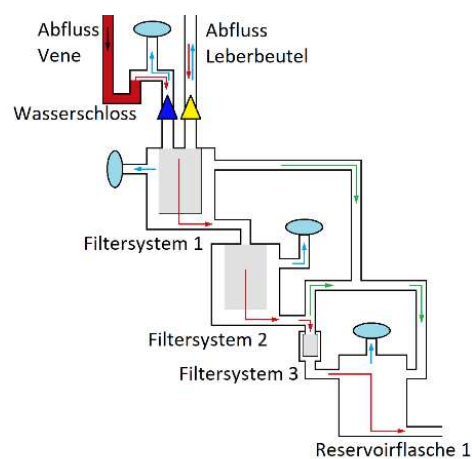


Abbildung Nr. 17: Physiologische Leberbewegung: (1.) Aufbau; (2.) Strukturzeichnung; (3.) Strukturzeichnung Schaltkreis

das Zwerchfell. Die Präparation der Leberplattform an das mit dem Leberparenchym verbundene Diaphragma konnte ex vivo innerhalb einer sterilen Schale erfolgen. Die Bewegung wurde durch einen Hochdrehmoment Schneckengetriebe-DC-Motor (12V; 20 RPM; Walfront®) induziert. Die in Reihe geschaltete Drehzahlregler-Leiterplatte (Betriebsspannung 10 V; Walfront®) mit dem DC-Motor und einem Sicherungsschalter ermöglichte eine genaue Drehzahlregulierung. Über einen AC/DC-Wandler (12 V) erhielt der Motor Strom vom Stromnetz (230 V). An den Antriebszapfen der Getriebeeinheit wurde ein exzentrischer Ausleger montiert, der über eine Leine und Umlenkrollen, befestigt an einem eigens konstruiert und hergestellten Stativ, mit der Leberplattform verbunden war. Diese kinematische Kette erzeugte während der Motorbewegung eine oszillierende, vertikale Auf- und Abwärtsbewegung mit einstellbarem Bewegungshöhenunterschied und Bewegungsfrequenz (Abbildung Nr. 17).

2.6.2. Filtersystem mit integriertem Wasserschloss

Um ein durch Zellreste und das retrograde Eindringen von Luftblasen ausgelöstes Auftreten thromboembolischer Ereignisse zu vermeiden, wurde für den Zirkulationskreislauf ein Filtersystem mit integriertem Wasserschloss konstruiert: Das Medium floss von der Leber über die V. cava inferior und einen großlumigen Venenkatheter in den venösen Abflussschlauch zum Wasserschloss. Das Wasserschloss



Legende








		
		
		

Abbildung Nr. 18: Filtersystem mit integriertem Wasserschloss

nutzte das Prinzip, dass Gase durch die niedrigere Dichte in Flüssigkeiten nicht nach unten dringen können. Durch die Form des in dem Wasserschloss befindlichen Schlauchsystems konnte ein stetiger Flüssigkeitsspiegel erhalten und das retrograde Eindringen der Luft in den venösen Abfluss verhindert werden. Vor Anschluss des Venenkatheters mit dem venösen Abfluss wurde dieser entlüftet. Durch den luftdichten

Verschluss von V. cava inferior mit dem Venenkatheter und dem Venen-Abfluss, die mangelnde Möglichkeit Luft retrograd über das Wasserschloss zu ziehen und das unterschiedliche Höhenniveau von Leber und Wasserschloss entstand im venösen System ein negativer Druck. Um den kontinuierlichen Fluss aus der Vene zu fördern und einen Blutrückstau zu verhindern, konnte das durch das Medium verdrängte Gas hinter dem Wasserschloss über einen Luftfilter mit der Porengröße 2 µm entweichen. Sowohl das Medium des Venen-Abflusses als auch das des Beutel-Abflusses liefen über ihre jeweiligen Probeentnahme-Ventile in der ersten Filterflasche zusammen und weiter über die zweite und dritte Filterflasche in das Reservoir. Die in den Filterflaschen befindlichen Filtersysteme bestanden aus eigens konstruierten, während der Perfusion wechselbaren und autoklavierbaren Edelstahl-Filtern. Das Filtersystem 1 beinhaltete einen Filter mit der Porengröße 1 mm, Filtersystem 2 einen Filter mit der Porengröße 100 µm und Filtersystem 3 einen Filter mit der Porengröße 50 µm. Filterflasche 1 und 2 enthielten Luftfilter mit der Porengröße 2 µm. Um bei einem Verschluss eines Filters eine fortbestehende Zirkulation zu gewährleisten, wurden dem abfließenden Filtersystem Überdruckflussschläuche eingebaut (*Abbildung Nr. 18*).

2.6.3. Dialyse

Die fehlende Einstellung der Mineralstoffe und des pH-Wertes sowie die erhöhten Konzentrationen an Harnstoff in den Vorversuchen zeigten die Notwendigkeit der Implementierung eines Dialysekreislaufs in ein Langzeit Normothermes Leberperfusionssystem. Die Dialyse bestand aus einem Kreislauf des zu dialysierenden Mediums und einem Zu- und Ablauf des Dialysats, angetrieben über eine peristaltische Pumpe und verbunden über einen Dialysefilter (Gambro®). Dabei wurde das Medium aus der ersten Reservoirflasche 1 über den Dialysefilter in die Reservoirflasche 2 und das Dialysat über die Dialyseflasche gegenläufig zum Perfusionsmedium im Dialysefilter in die Dialysatabwurf flasche gepumpt (*Abbildung Nr. 19*). Eine direkte Herstellung des Dialysats während des Versuches ermöglichte die Anpassung desselbigen an die aktuellen individuellen Blutwerte und damit eine indirekte Regulation des Mineralstoffhaushalts. Für die Produktion des Dialysats wurden unter sterilen Bedingungen die für eine optimale Mineralstoffkonzentration im Blutmedium ermittelten Salze Natriumchlorid (NaCl), Kalziumchlorid (CaCl₂), Magnesiumchlorid Hexahydrat

(MgCl₂ · 6H₂O), Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (Na₂H₂PO₄), Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) und Glucose (C₆H₁₂O₆) sterilem Wasser (Ampuwa®) zugeführt. Die Hinzugabe der SAM, sowie Heparin, TUDCA-Lösung und Insulin verhinderte ein Herauswaschen der zugeführten Medikamente.

2.6.4. Parenterale Nährstoffzufuhr

Intrakorporal erhält eine Leber physiologisch über die V. portae ein mit Nährstoffen angereichertes Blut, das zum Eigen- und Fremdbedarf verstoffwechselt wird. Darüber hinaus bildet die Wiederaufnahme von Gallensalzen über den enterohepatischen Kreislauf die Grundlage einer ausreichenden Produktion von Galle. Um beides im extrakorporalen Lebermodell zu simulieren, wurde eine Nährstoffzufuhr über einen peristaltischen Perfusor in die V. portae implementiert. Die Grundlage der Nährstofflösung bildete William's E Lösung®. Neben einer Antibiose und Antimykose (1 SAM / L Parenterale Ernährung) enthielt die Nährstofflösung Insulin zur Förderung der Glykolyse sowie Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA-Lösung) zum Erhalt des enterohepatischen Kreislaufes (*Tabelle Nr. 6*).

2.6.5. Stase-Prophylaxe während Hepatektomie

Durch die Verwendung von DCD-Spenderlebern lag während der Hepatektomie ein Kreislaufstillstand mit resultierender intrahepatischer Blutstase vor. Mit dem Ziel eines kontinuierlichen Flusses und der Verhinderung einer thrombotischen Zellaggregation wurde nach Kanülierung der V. portae über diese intraoperativ, angetrieben durch eine peristaltische Pumpe, ein Liter eines oxygenierten Perfusionsmediums gegeben. Ein passiver Abfluss über die V. cava inferior in ein steriles Abflussgefäß verhinderte eine portale Hypertension und Anschwellung des Leberparenchyms.

2.6.6. Standardisierter Medikationsplan

Die Kontrolle eines konstanten Medikationsspiegels im Perfusionsmedium wurde über eine konstante Medikamentengabe über Perfusoren sowie über die dem Dialysat zugeführte Medikation gesteuert. Zur Prophylaxe einer Kontamination erhielt sowohl das zu Beginn verwendete Perfusionsmedium, als auch das Dialysat und die parenterale Nährstoffzufuhr pro Liter eine SAM^{a/b}-Dosis (*Tabelle Nr. 4*). Die Heparinisierung der fortlaufenden Leberperfusion erfolgte mit einer kontinuierlichen Gabe von 1.000 I.E./h. Über die permanente Gabe der Parenteralen Nährstoffzufuhr mit 50 ml / 3h, erfolgte die Medikation von Insulin mit 12 I.E. / 3 h und von TUDCA-Lösung mit 5 µmol / 3h. Eine mögliche Azidose wurde weiterhin über eine individuelle Gabe von Natriumhydrogencarbonat und eine mögliche Hypokalziämie über eine Zufuhr von Kalziumchlorid korrigiert (*Tabelle Nr.6*).

Tabelle Nr. 6: *Standardmedikationsplan*

	Dauermedikation	Parenterale Ernährung [1L]	Dialysat [1L]
SAM^{a/b}	-	1/L	1/L
TUDCA-Lösung	5 µmol / 3h	100 µmol	5 µmol
Insulin	12 I.E. / 3h	240 I.E.	12 I.E.
Williams'E Medium	-	1 l	-
Parenterale Ernährung	50 ml / 3h		

2.6.7. Sekundärkreislauf

Der Sekundärkreislauf entsprach in den Grundzügen dem Primärkreislauf, einer dualen Versorgung der Spenderleber über die V. portae und A. hepatica unter normothermen Bedingungen innerhalb des im Primärkreislauf beschriebenen Zellreaktors. Zusätzlich wurde eine über das Zwerchfell generierte Leberbewegung, eine Dialyse und ein Filtersystem mit integriertem Wasserschloss implementiert.

Der Austausch der internen Pumpe aus den Vorversuchen mit einer peristaltischen externen Zirkulationspumpe erfolgte mit dem Ziel eines höheren Flussvolumens. Darüber hinaus wurden eine parenterale Ernährung über einen Perfusor in die V. portae zur Herstellung eines physiologischen nährstoffreichen Pfortadermediums und ein Heparinperfusor für eine kontinuierliche Antikoagulation integriert (Abbildung Nr. 19).

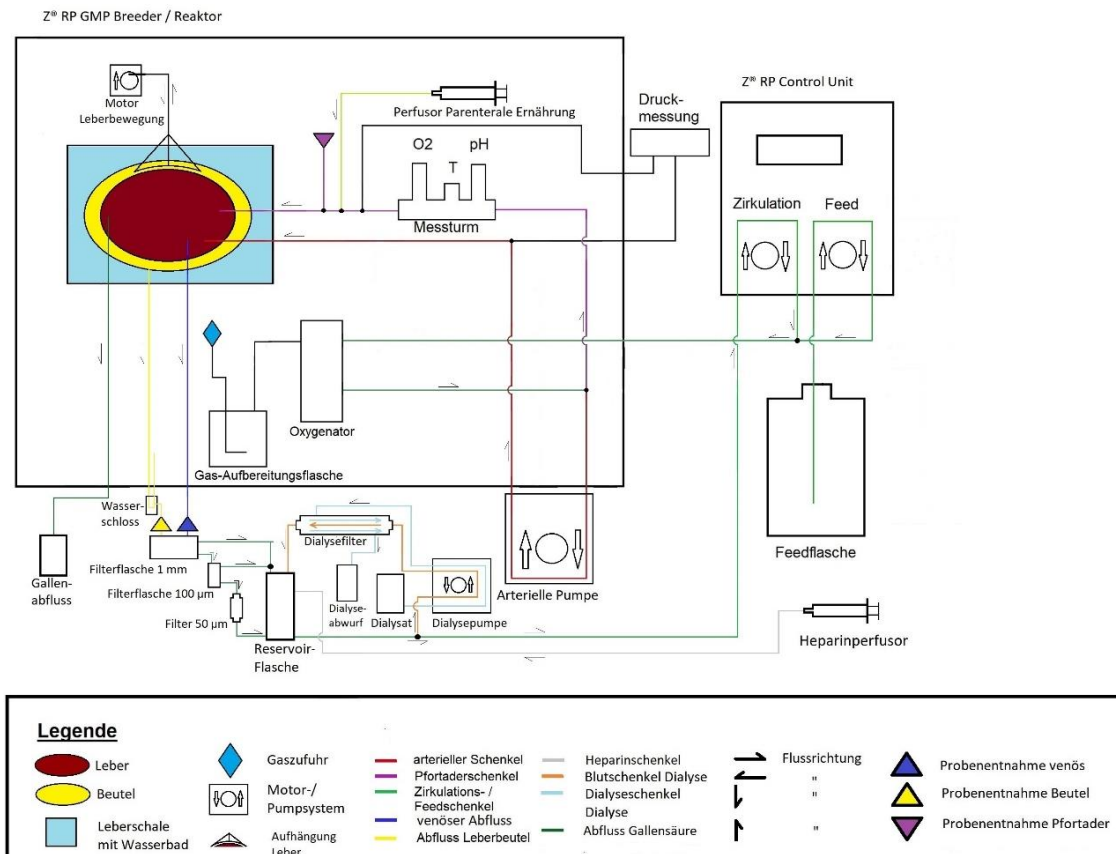


Abbildung Nr. 19: Strukturzeichnung Sekundäres Leberperfusionssystem

2.7. Experiment NLP im Sekundärkreislauf (E1-NLP-SK)

2.7.1. Zielsetzung

Die Zielsetzung dieses Versuches war die Testung des neu etablierten Sekundären Leberperfusionssystems in einem Langzeitversuch über 48 h (128).

2.7.2. Versuchsdurchführung

Der Versuchsaufbau entsprach dem Sekundären Normothermen Leberperfusionssystem (*Abbildung Nr. 19*) und die Versuchsdurchführung der Basisdurchführung (128). Mit dem Ziel eines physiologischen Perfusionsmediums wurde das in den Vorversuchen verwendete Medium zu einer Lösung, bestehend aus Erythrozytenkonzentrat und Blutplasma, verändert (128). Das Blutplasma konnte während des Prozesses der Herstellung von Erythrozytenkonzentrat als Nebenprodukt gewonnen werden. Die Zielkonzentration von Erythrozyten im Perfusionsmedium, bestimmt über die Hämoglobinkonzentration, lag weiterhin bei 3-6 g/dl. Das Perfusionsmedium erhielt zum Start SAM^a zur Kontaminationsprophylaxe (*Tabelle Nr. 4*) (128). Die Problematik des schlechten Zuflusses in die A. hepatica und des Abflusses aus dem DHC über eine Venenverweilkanüle wurde durch die Verwendung einer Knopfkanüle ($\varnothing = 0,5$ mm) für die Arterie und eines Nelaton-Katheters® ($\varnothing 4,67$ mm) für den Gallengang bearbeitet. Der bessere Abfluss aus der V. cava inferior konnte über einen, während der Hepatektomie eingebrachten, großlumigen Katheter ($\varnothing = 7,3$ mm) sichergestellt werden. Die Einstellung der Bewegungsfrequenz während der Leberperfusion wurde auf eine physiologische Atemfrequenz von 20 rpm eingestellt, mit einer Höhenbewegungsdifferenz von ca. 3 cm (128). Die fortlaufende Medikation während der Leberperfusion, sowie zur Herstellung von Dialysat und der Parenteralen Nährstoffzufuhr, entsprach dem Medikationsplan (*Tabelle Nr. 6*) (128). Die eigestellte Sauerstoffgabe über den Oxygenator lag bei einer leichten Hyperoxie. Die BGA-Messungen aus V. portae, A. hepatica und Leberbeutel erfolgten stündlich und die histologische Probengewinnung alle 24 Stunden (128).

2.7.3. Versuchsergebnisse

Die für diesen Versuch benötigte Operationszeit betrug 1,43 Stunden. Mit der intraoperativen Perfusion konnte 0,75 Stunden nach Operationsstart begonnen werden. Die entnommene Spenderleber hatte ein Gewicht von 1,72 kg (128). Die Perfusionszeit im Labor lag bei 53,62 Stunden (128). Dabei konnte der Druck der Pfortader im Durchschnitt bei $10,09 \pm 25,87$ mmHg und der der A. hepatica bei $112,88 \pm 68,52$ mmHg gehalten werden. Die Temperatur im Reaktor betrug im Durchschnitt $38,09 \pm 2,07$ °C und innerhalb der Zirkulation $33,20 \pm 1,77$ °C. Das Hämoglobin fiel nach anfänglichen Konzentrationen von 7,70 g/dl auf Konzentrationen von 0,46 g/dl innerhalb der Vene. Nach ca. 24 Stunden stieg die Hämoglobinkonzentration ohne eine externe Hinzugabe von Erythrozytenkonzentrat wieder an. Insgesamt wurden der Leber 360 ml Erythrozytenkonzentrat verabreicht. Trotz einer Zufuhr von 0,20 mol Natriumhydrogencarbonat lag sowohl in der Pfortader mit einem pH-Wert von $7,07 \pm 0,21$, als auch in der Vene mit $6,66 \pm 0,19$ eine Azidose vor. Während des Versuchsverlaufs verbesserte sich der pH-Wert und erreichte im späteren Versuchsverlauf physiologische Werte. Bei einer durchschnittlichen pO_2 -Zufuhr von $140,83 \pm 14,88$ mmHg zeigte sich eine erhöhte pCO_2 -Konzentration innerhalb der Vene von anfänglich 160 mmHg, die nach ca. 24 Stunden stark auf einen Mittelwert von $86,56 \pm 42,35$ mmHg abfiel. Über den gesamten Perfusionszeitraum konnte die Leber konstant mit einer Frequenz von 20 rpm mit einem Höhenunterschied von 3 cm vertikal bewegt werden (128). Die Anzahl der durchgeführten Dialysen belief sich auf insgesamt zehn, mit je einem Liter Dialysat (Dialyselauftrate 190 ml/h) (128). Dabei konnte die anfänglich im nicht messbaren Bereich liegende Kaliumkonzentration sowohl in Pfortader als auch Vene gesenkt werden, mit einer Endkonzentration von 6,7 mmol/l in der Pfortader (128). Die Konzentrationen von Natrium mit $142,60 \pm 12,96$ mmol/l und Chlorid mit $102,46 \pm 6,56$ mmol/l, bestimmt für die Pfortader, blieben nach der ersten Dialyse im Normbereich und die Kalziumkonzentration mit $0,68 \pm 0,13$ mmol/l blieb trotz starkem Verbrauch auf einem konstanten Niveau (128). Die Gabe von Kalziumchlorid belief sich auf 4,25 mmol. Es zeigten sich starke Reperfusionsschäden zu Beginn der maschinellen Perfusion. Dies äußerte sich in der Laboranalyse durch einen anfänglichen Anstieg der GOT-Aktivität auf einen Maximalwert von 22772,99 U/l (128). Dieser fiel zum Ende des Versuches wieder ab (128). Im Mittel betrug die GOT-Aktivität $16493 \pm 5387,25$ U/l. Die Albumin-

Konzentration sank zu Beginn auf ein Minimum von 2,91 g/dl und stieg nach 24 Stunden stark an mit einer mittleren Konzentration von $5,7 \pm 2,28$ g/dl. Zu Beginn und zum Ende des Versuches zeigten sich erhöhte Harnstoffkonzentrationen. Durchschnittlich betrug dieser 63,12 mg/dl. Die Leber produzierte 45 ml Gallenflüssigkeit (Abbildung Nr. 20) (128).

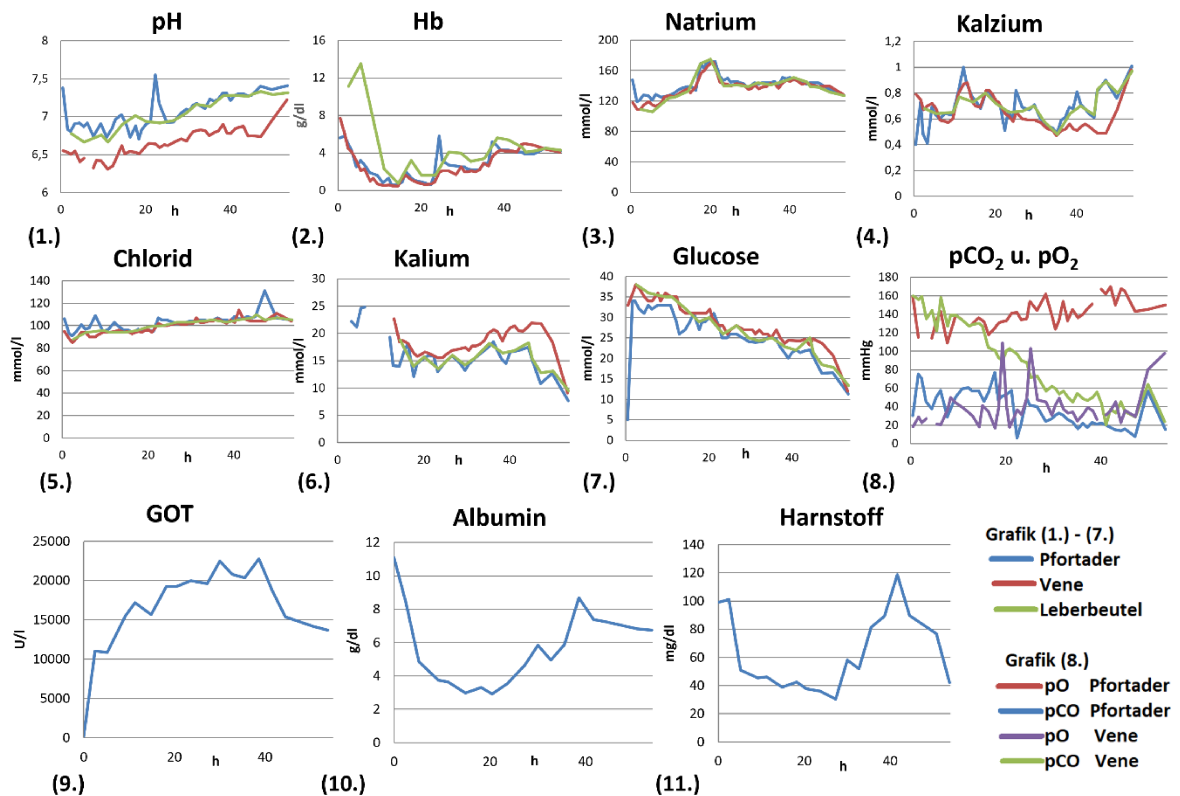


Abbildung Nr. 20: Blutgasanalyse und Laborauswertung E1-NLP-SK

Makroskopisch stellte sich die Leber innerhalb der ersten 24 Stunden verhärtet, auerginefarben mit heterogenen oberflächlichen Gallenablagerungen und Cholestasezeichen dar. Im fortgeschrittenen Verlauf dieses Versuches verschwanden die Ablagerungen von Galle, das Gewebe wurde weicher und entwickelte eine braunrötliche Farbe. Mikroskopisch konnte in der H.E.-Färbung ein weitgehend physiologisch erhaltenes Leberparenchym nachgewiesen werden (128). Ersichtlich wurde eine erhaltene Läppchenstruktur des Gewebes sowie ein zellkernreiches histologisches Bild. Im Vergleich zu den Vorversuchen fielen darüber hinaus eine physiologische Sinusoidenbreite und morphologisch unauffällige Hepatozyten auf. Des Weiteren wurden Bereiche mit intrasinusoidalen Erythrozytenaggregaten detektiert (Abbildung Nr. 21).

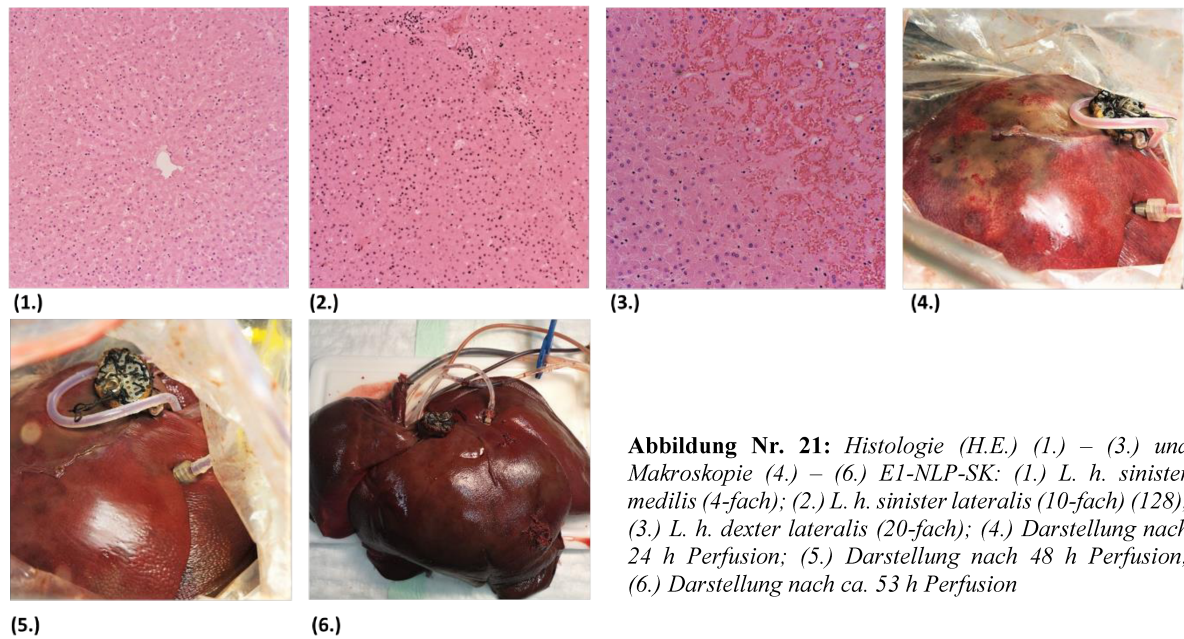


Abbildung Nr. 21: Histologie (H.E.) (1.) – (3.) und Makroskopie (4.) – (6.) E1-NLP-SK: (1.) L. h. sinister medialis (4-fach); (2.) L. h. sinister lateralis (10-fach) (128); (3.) L. h. dexter lateralis (20-fach); (4.) Darstellung nach 24 h Perfusion; (5.) Darstellung nach 48 h Perfusion; (6.) Darstellung nach ca. 53 h Perfusion

2.7.4. Versuchsanalyse

Mit diesem Versuch konnte eine Normotherme Leberperfusion von über 53 Stunden durchgeführt werden (128). Die anfänglich starke Gewebeschädigung, die sich sowohl in der laborchemischen Analyse mit erhöhten GOT-Aktivitäten als auch in der Morphologie darstellte, ist mutmaßlich das Resultat eines Sauerstoffmangels, ausgelöst durch eine erniedrigte Erythrozytenkonzentration. Die steigende Hämoglobinkonzentration und eine resultierende Erhöhung der Sauerstoffträgerkonzentration nach 24 Stunden sorgten im Anschluss für eine ausreichende Sauerstoffzufuhr, die zum histologischen Erhalt, einer Reduktion von GOT und der Produktion von Albumin und Gallenflüssigkeit führte. Die Integration einer Leberbewegung ergab neben einer Verbesserung der Morphologie der unten liegenden Leberanteile einen physiologischen pulsatilen Rückfluss aus der V. cava inferior (128). Ebenso erfolgreich zu werten war die Implementierung einer Dialyse, eines Filtersystems und einer Nährstoffzufuhr mit Erhalt des enterohepatischen Kreislaufes (128).

2.8. Erste Standardversuchsreihe (SVR1)

2.8.1. Zielsetzung

Nach der erfolgreichen Leberperfusion in E1-NLP-SK über 53 Stunden, beruhte der nächste Schritt dieser Arbeit auf der Testung der Reproduzierbarkeit dieses Versuches über eine Versuchsreihe (n = 3) mit einer Langzeitperfusion von bis zu 72 h.

2.8.2. Versuchsdurchführung

Der Versuchsaufbau entsprach dem Sekundären Normothermen Leberperfusionssystem mit der Ergänzung eines Wärmeaustauschers (*Astotherm® plus* ®) im zuführenden Schenkel der Arterie und der Pfortader zur Erhöhung und Stabilisierung der Zirkulationstemperatur. Die Versuchsdurchführung entsprach der Basis- und Versuchsdurchführung E1-NLP-SK. Mit dem Ziel einer Verringerung der Zellschwellung wurde dem Medikationsplan die Zugabe von Albumin (bei Bedarf) zugefügt. Für die Datenanalyse erfolgten innerhalb der ersten 24 Stunden der Leberperfusion die Probenentnahmen aus Pfortader und Vene stündlich und nach den ersten 24 Stunden alle drei Stunden. Mit dem Ziel einer Verringerung der Manipulation von Lebergewebe und Perfusionsfluss wurde von einer histologischen Probenentnahme während der Versuchsdurchführung abgesehen und diese nach Beendigung der Perfusion durchgeführt. Um die Auswertung der BGA nicht zu verfälschen, berechnete sich der Gesamtmittelwert aus einem alle drei Stunden ermittelten Mittelwert der ersten 24 Versuchsstunden und den dreistündlich vorliegenden Werten nach den ersten 24 Stunden. Für die Analyse der Mineralstoffe und der zellulären Bestandteile wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Pfortader und Vene zusammen berechnet.

2.8.3. Versuchsergebnisse

Für die Versuchsreihe SVR1 wurden insgesamt drei Normotherme Leberperfusionsen durchgeführt. Dabei betrug die Perfusionszeit von E2-NLP-SK 72,73 Stunden und die von E3-NLP-SK 72,63 Stunden. E4-NLP-SK wurde nach 50,05 Stunden abgebrochen. Die durchschnittliche Operationsdauer lag bei $1,41 \pm 0,28$ h. Die Spülung der Leber mit

dem oxygenierten Perfusionsmedium wurde dabei nach $0,59 \pm 0,15$ h durchgeführt. Das Gewicht der entnommenen Spenderleber betrug durchschnittlich $1,78 \pm 0,09$ kg (Tabelle Nr. 7).

Tabelle Nr. 7: Basisdaten SVR1; (*Leberperfusionszeit)

Versuch	Gewicht [kg]	OP-Zeit [h]	LP-Zeit* [h]
E2-NLP-SK	1,7	1,12	72,73
E3-NLP-SK	1,76	1,45	72,63
E4-NLP-SK	1,87	1,67	50,05

Die Temperatur innerhalb des Reaktors konnte bei $36,29 \pm 0,53$ °C und die der Zirkulation bei $36,72 \pm 0,38$ °C eingestellt werden. Der portale Druck lag im Mittel bei $19,49 \pm 5,68$ mmHg und der arterielle bei $250,30 \pm 91,33$ mmHg und damit außerhalb des vordefinierten physiologischen Bereichs. Dabei zeigten sich in der Pfortader Spitzenwerte von bis zu 78,32 mmHg und in der Arterie Blutdrücke von über 500 mmHg.

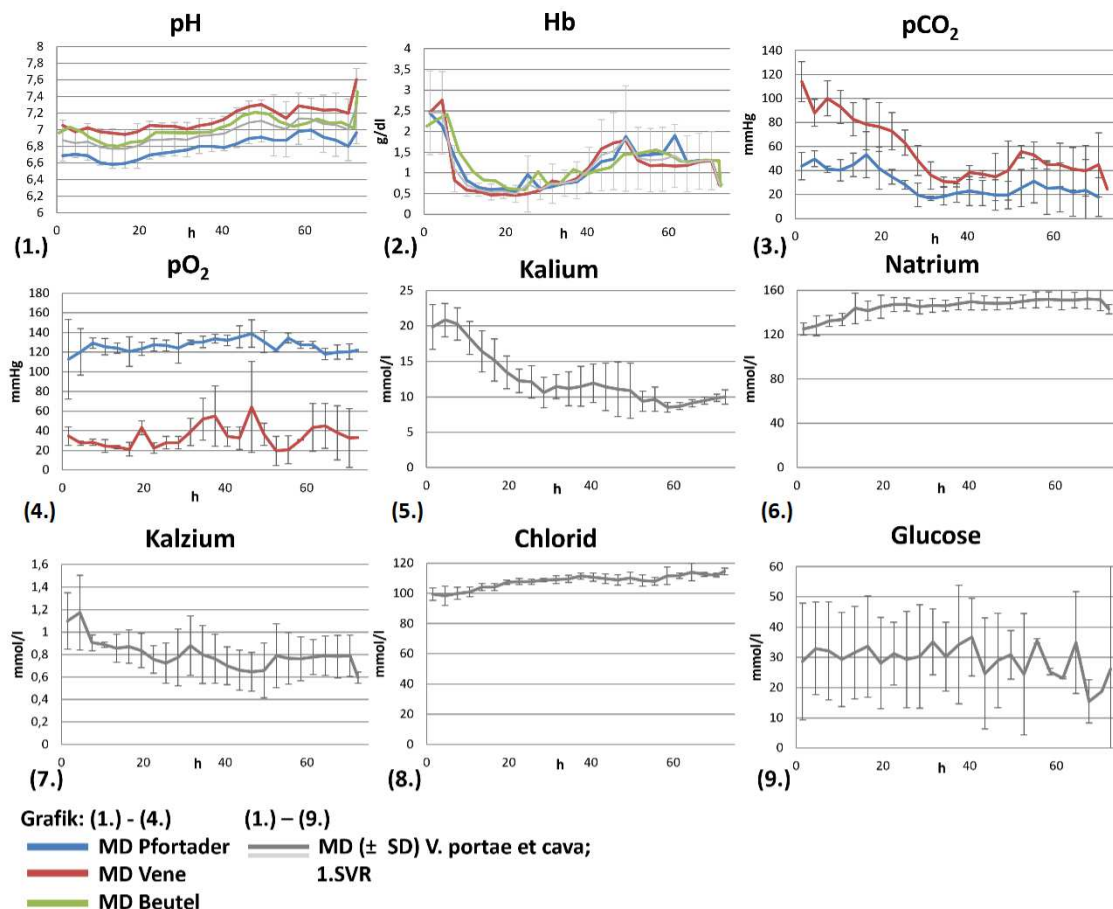


Abbildung Nr. 22: Blutgasanalyse SVR1

Durch die Verwendung von Knopfkanülen aus Edelstahl konnte ein Abknicken des Katheters verhindert werden, jedoch war eine mechanische Blockade durch den starren, für die Leberschale zu langen Katheter innerhalb der Arterie zu beobachten. Mit durchschnittlichen pH-Werten in der Pfortader von $7,1 \pm 0,12$ und in der Vene von $6,76 \pm 0,05$ lag eine starke Azidose vor. Die durchschnittliche Gabe von Natriumhydrogencarbonat lag bei $0,24 \pm 0,09$ mol (*Tabelle Nr. 8*). Der venöse pCO_2 -Wert fiel unter einer durchschnittlichen pO_2 Gabe von $126,32 \pm 6,16$ mmHg nach anfänglich erhöhten Werten von $113,98 \pm 16,71$ mmHg ab. Über die Durchführung einer Dialyse mit $176,67 \pm 15,26$ ml/h Dialysat konnten die Mineralstoffe in einem stabilen Bereich gehalten werden. Dabei betrug der Mittelwert für Natrium $144,96 \pm 7,50$ mmol/l, für Kalzium $0,80 \pm 0,13$ mmol/l und für Chlorid $107,97 \pm 4,495$ mmol/l. Die Medikation von Kalziumchlorid lag durchschnittlich bei $4,17 \pm 0,76$ mol (*Tabelle Nr. 8*). Eine anfänglich stark erhöhte Konzentration von Kalium mit durchschnittlich $19,86 \pm 3,16$ mmol/l wurde innerhalb der ersten 24 Stunden auf $12,25 \pm 1,65$ mmol/l gesenkt. Die gesamt berechnete Kaliumkonzentration belief sich auf $12,53 \pm 3,75$ mmol/l. Die Glucosekonzentration lag bei $29,24 \pm 5,22$ mmol/l (*Abbildung Nr. 22*).

Die Laboranalyse ergab stark erhöhte GOT- und GPT-Aktivitäten. So lagen die Aktivitäten von GOT mit einem Mittelwert bei $32407,40 \pm 9210,84$ U/l mit Spitzenwerten von $59539,00$ U/l und von GPT durchschnittlich bei $742,82 \pm 58,75$ U/l. Die Albuminkonzentration von $3,33 \pm 1,01$ g/dl konnte mit einer durchschnittlichen Zugabe von $47,67 \pm 10,79$ g Albumin in einem physiologischen Bereich gehalten werden (*Tabelle Nr. 8*). Ebenso lag die Harnstoffkonzentration mit $27,87 \pm 7,76$ mg/dl unterhalb eines kritischen Wertes. Auffällig war ein starker Rückgang der gemessenen zellulären Blutanteile zu Beginn der Versuche. So sank der Hämatokrit innerhalb der ersten 12 Stunden von einem initial durchschnittlich gemessenen Wert von $10,7 \pm 3,90$ % auf Werte < 1 %. Besonders ersichtlich war dies an der Konzentrationsminderung der Erythrozyten, bei denen nach 12 Stunden im Durchschnitt lediglich $7,26$ % der Anfangskonzentration, trotz einer durchschnittlichen Zufuhr von $179 \pm 19,31$ ml Erythrozytenkonzentrat, vorlag (*Tabelle Nr. 8*). Der starke Rückgang der Erythrozyten zeigte sich ebenso an der in der

BGA gemessenen Hb Konzentration, die im Durchschnitt innerhalb der Pfortader $1,17 \pm 0,33$ g/dl betrug (Abbildung Nr. 22 und 23).

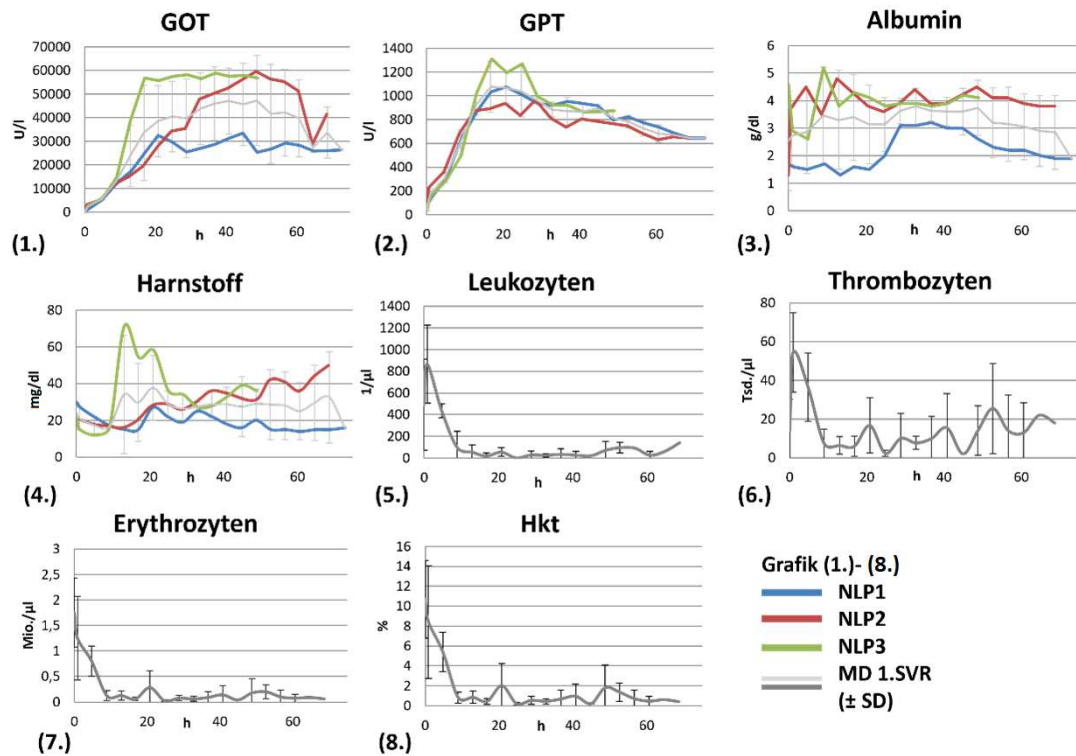


Abbildung Nr. 23: Laboranalyse SVR1

Sowohl die makroskopische als auch die mikroskopische Analyse lieferten ein sehr heterogenes Bild: Morphologisch zeigten sich sowohl eine aufgequollene, hypertrophe, auberginefarbene Leber mit Stauungssymptomatik, v.a. zu Beginn der Versuche, als auch ein weiches, schwammiges Parenchym mit diffuser weißlich schimmernder Oberfläche. Die Histologie ergab sowohl große azelluläre ischämische Bereiche als auch Areale mit erhaltenen Zellkernen. Es wurden hypertrophe Sinusoide und strukturelle Veränderungen nachgewiesen. Allen Versuchen gemein war das Vorhandensein von erythrozytären Zellaggregaten innerhalb der Sinusoiden. In der mikroskopischen Analyse des Perfusionsmediums in E4-NLP-SK konnte eine Pseudoagglutination von Erythrozyten nachgewiesen werden.

Durch ein Experiment mit dem in den Versuchen verwendeten Blutplasma konnte die Bildung von Fibrinstrukturen bei Hinzugabe von Kalziumionen in heparinisiertem

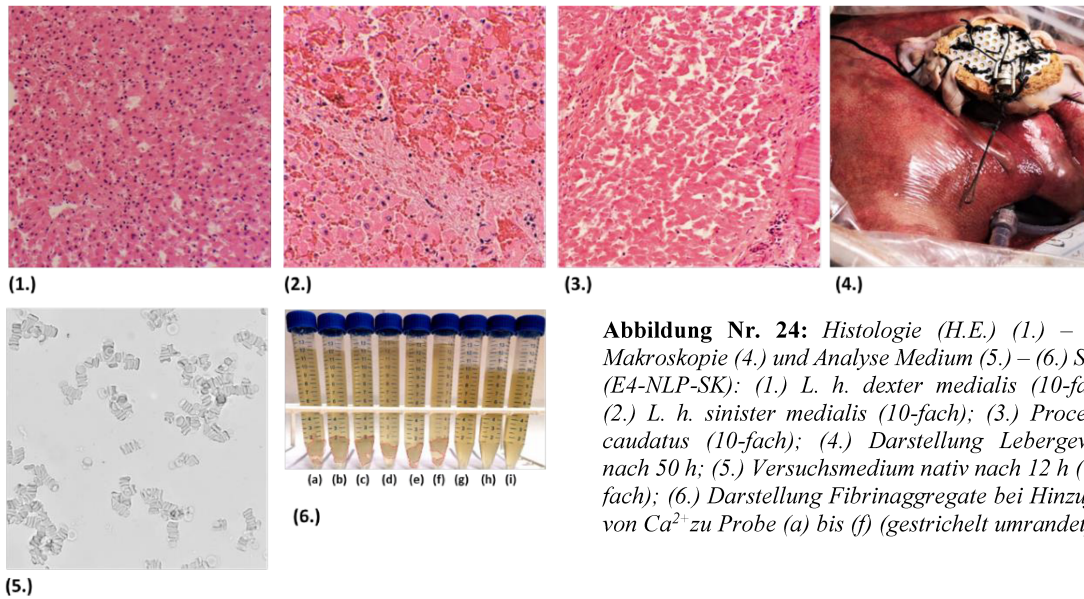


Abbildung Nr. 24: Histologie (H.E.) (1.) – (3.), Makroskopie (4.) und Analyse Medium (5.) – (6.) SVR1 (E4-NLP-SK): (1.) L. h. dexter medialis (10-fach); (2.) L. h. sinister medialis (10-fach); (3.) Processus caudatus (10-fach); (4.) Darstellung Lebergewebe nach 50 h; (5.) Versuchsmedium nativ nach 12 h (100-fach); (6.) Darstellung Fibrinaggregate bei Hinzufuhr von Ca^{2+} zu Probe (a) bis (f) (gestrichelt umrandet)

Blutplasma nachgewiesen werden: Für diesen Nachweis wurden jeweils 10 ml des kommerziell hergestellten Blutplasmas (a-c), des heparinisierten, kommerziell hergestellten Blutplasmas (d-f) und eines durch Zentrifugation und Filtrierung hergestellten Blutserums (g-i) in Flacons mit 1 mmol Kalziumchlorid versetzt. Sowohl in den heparinisierten, als auch in den nicht heparinisierten Flacons mit Blutplasma war die Bildung von makroskopisch sichtbaren Fibrinpolymeren nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C zu beobachten. Die Kontrollproben mit Blutserum wiesen keine makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen auf (Abbildung Nr. 24).

Tabelle Nr. 8: Medikamentengabe SVR1

	E2-NLP-SK	E3-NLP-SK	E4-NLP-SK
Erythrozytenkonzentrat [ml]	200	162	175
Heparin [I.E./h]	1.000	1.000	1.000
Insulin [I.E./h]	4	4	4
TUDCA [I.E./3h]	5	5	5
NaHCO ₃ [mol]	0,30	0,29	0,13
CaCl ₂ [mmol]	4	5	3,5
Albumin [g]	43	40	60
Glucose 20 % [ml]	8	0	0

2.8.4. Versuchsanalyse

Mit der Versuchsreihe SVR1 konnte der zuvor durchgeführte Versuch E1-NLP-SK nicht repliziert werden. Zwar konnte mit der Implementierung eines Wärmeaustauschers eine stabilere Temperatur innerhalb des Reaktors und der Zirkulation gehalten werden, jedoch ergab die Versuchsanalyse stark erhöhte Blutdrücke, sowohl in der Pfortader als auch in der Arterie, die als Resultat fehlerhafter Messungen durch eine mechanische Blockade der Arterie hinter der Drucksonde zustande kamen. Die Instabilität des Systems zeigte sich weiterhin an einer nicht korrigierbaren Azidose des Mediums sowie an den Ergebnissen der Laboranalyse, die mit stark erhöhten GOT- und GPT-Aktivitäten eine Schädigung des Lebergewebes widerspiegeln, was sich ebenfalls in der histologischen Analyse bestätigte. Das Kernproblem der Versuchsreihe offenbarte sich in einer mangelnden Zufuhr von Sauerstoff über den verwendeten Sauerstoffträger: Zwar wurde dem Perfusionsmedium über den Oxygenator eine ausreichende Menge an O₂ zugeführt, jedoch konnte trotz einer intensivierten Erythrozytengabe deren Konzentration nicht im Perfusionsmedium gehalten werden, mit dem Ergebnis einer starken Anämie. Die Detektion der vorliegenden Ursache der Blutarmut gestaltete sich als komplex: Der Nachweis von Erythrozytenaggregaten innerhalb der Leber und einer Pseudoagglutination innerhalb des Mediums wiesen auf eine Blutstase im vasalen System hin. Die Bildung von Fibrinstrukturen bei der Hinzugabe von Kalziumchlorid förderte dabei mutmaßlich den Prozess der Thrombenbildung.

2.9. Entwicklung Tertiärkreislauf

Die Entwicklung des Tertiärkreislaufes befasste sich insbesondere mit der Fragestellung einer ausreichenden Oxygenierung der Hepatozyten durch eine Verhinderung der Blutstase mit dem angestrebten Ergebnis einer stabilen Erythrozytenkonzentration im Perfusionsmedium (Abbildung Nr. 25 und 26).

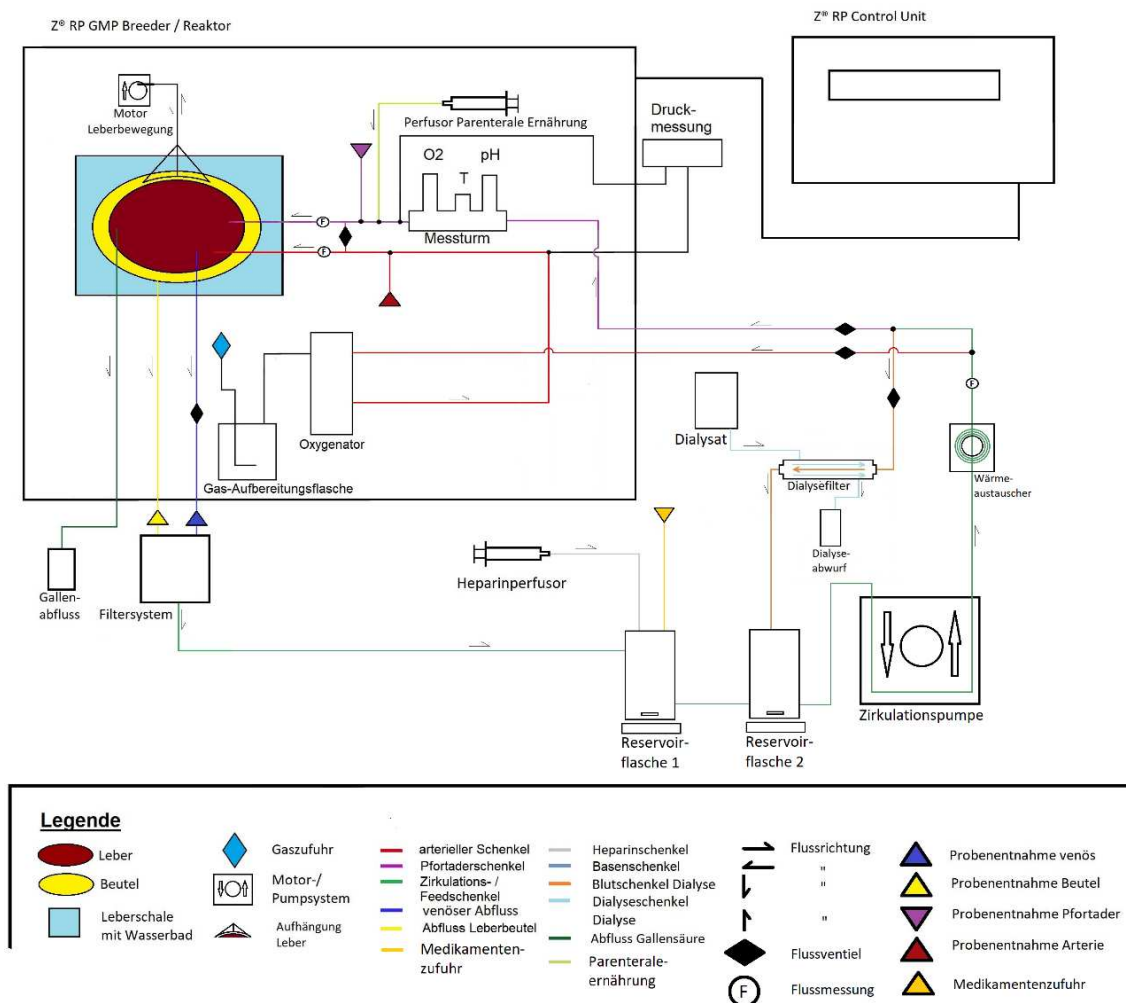


Abbildung Nr. 25: Strukturzeichnung Tertiäres Leberperfusionssystem

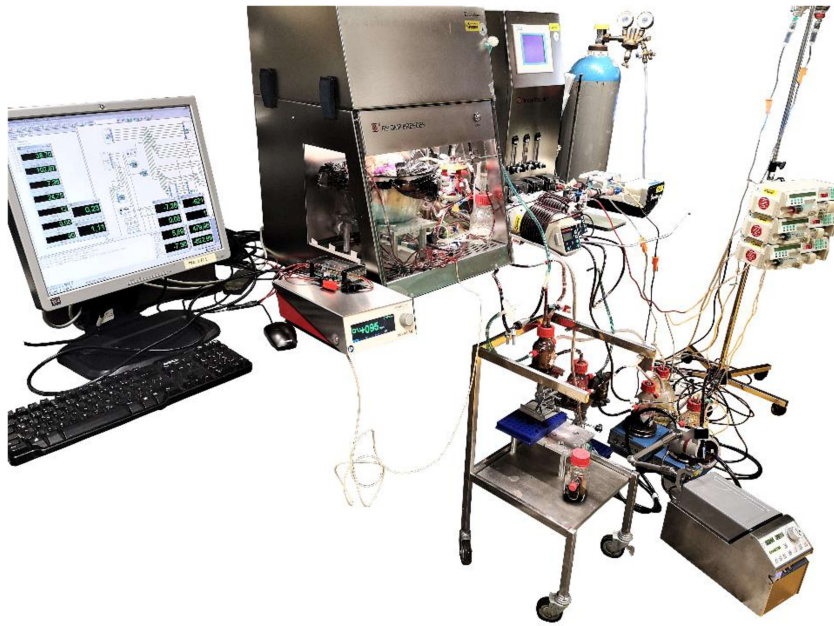


Abbildung Nr. 26: Tertiäres Leberperfusionssystem (129)

2.9.1. Entwicklung arterieller Katheter

Für die optimale arterielle Perfusion wurden spezielle Knopfkanülen entwickelt (Abbildung Nr. 27): Das Material bestand aus rostfreiem Edelstahl zur Prophylaxe eines Abknickens des Katheters, wie in den Vorversuchen beobachtet und zum wiederholten Gebrauch durch Autoklavierung. Die Länge der Kanülen wurde für eine bessere Lagerung der Arterie innerhalb der Leberschale gekürzt. Zur Vermeidung thrombotischer Materialien innerhalb der Kanüle und einer damit einhergehenden Nichtperfusion der Arterie, erhielt der Katheter mehrere Ausführungslöcher an der Katheterspitze. Ein „Knopf“, entsprechend einer kommerziellen Knopfkanüle, sicherte den Halt der Kanüle innerhalb des Gefäßes. Die Befestigung im Gefäß erfolgte entsprechend der Sicherung der anderen Kanülen über eine Ligatur. Um für jede vorliegende Größe von arteriellen

Gefäßen Katheter vorrätig zu haben, wurden diese in verschiedenen Größen hergestellt (\varnothing 0,4 bis 2 mm). Für die bestmögliche Perfusion empfahl sich die Verwendung des größtmöglichen Katheters.

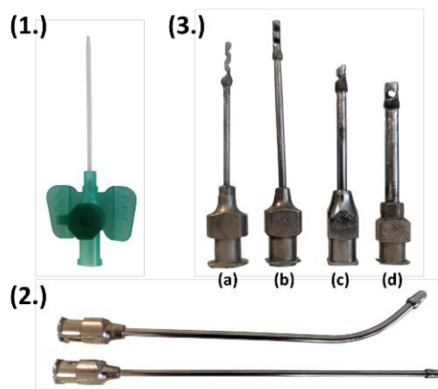


Abbildung Nr. 27: Entwicklung arterieller Katheter; (1.) pVK (Vasofix® Safety 24G; B/Braun®); (2.) Konventionelle Knopfkanülen (\varnothing 0,5 – 0,67 mm) gebogen und gerade; (3.) Modifizierte Knopfkanülen (a) \varnothing 0,4 mm, (b) \varnothing 0,5 mm, (c) \varnothing 0,66 mm, (d) \varnothing 2 mm

2.9.2. Optimierung Zirkulationskreislauf

Mit dem Ziel einer Reduktion einwirkender Schärkräfte auf die Erythrozyten, wurden die im Sekundären Kreislauf verwendeten, peristaltischen Pumpen für den Antrieb des arteriellen, portalen und Dialysat-Blutflusses durch eine einzige Zentrifugalpumpe (*Jostra (Maquet) Rotaflow Console®; Rotaflow RF-32®*) ersetzt. Die unterschiedlichen Drücke in den Kreisläufen konnten durch die Verwendung von Druckventilen manuell eingestellt werden. Über einen Shunt zwischen arteriellem und portalem Fluss, eingestellt über ein Druckventil, wurde unter Kontrolle eine physiologische Oxygenierung innerhalb der Gefäße erzeugt. Die Implementierung einer Blutflussmessung über einen Infrarotmesser (*Novaflow c Ultrasonic Flowcomputer®*) bot den Vorteil einer genauen Regulation des Flusses. Die Gabe von Epoprostenol als Medikation zur Vasodilatation hatte ebenfalls das Ziel einer verbesserten Zirkulation.

2.9.3. Druckkontrollierter venöser Abfluss

Die Problematik eines schlechten Zuflusses sowie einer entstehenden Blutstase wurde mit der Implementierung einer Druckmessung und -kontrolle über ein Druckventil innerhalb des venösen Abflusses bearbeitet. Diese Umstellung des Versuches beruhte auf der Hypothese, dass der vorhandene negative Druck innerhalb der Vene zu einer Kollabierung kleinerer Venolen führt, mit dem Ergebnis einer Blutstase und Schwellung der Leber. Die Einstellung des venösen Drucks definierte sich auf Werte zwischen -5 und +10 mmHg.

2.9.4. Optimierung Gaszufuhr

Innerhalb der Versuche im Primären- sowie im Sekundären Perfusionssystem zeigte sich ein schlecht über Natriumhydrogencarbonat einstellbarer pH-Wert. Dies resultierte zum einen aus einer hepatozellulären Ischämie und zum anderen aus den Grenzen des Oxygenators sowie des Zellreaktors, über den eine Gaszufuhr von maximal ein bar fließen konnte. Aus diesem Grund wurde die Gaszufuhr vom Reaktor selbst entkoppelt, sodass höhere Flüsse gegeben werden konnten und vermehrt CO₂ innerhalb des Oxygenators aus

der Zirkulation diffundieren konnte. Die automatische Regulation einer Alkalose über die Zufuhr von CO₂ wurde beibehalten.

2.9.5. Entwicklung gerinnungsfreies Medium

Heparin als Antikoagulator wirkt v.a. über die Bindung an Antithrombin und Thrombin über Exosite-2-Rezeptoren, wodurch sowohl Thrombin als auch Faktor Xa gehemmt werden. Die Bildung von Fibrinpolymären bei der Hinzugabe von Kalziumchlorid spiegelte demnach die Induktion einer Gerinnung mit bereits bestehenden oder neu produzierten Gerinnungsfaktoren wider. Aus diesem Grund war die Umstellung des Perfusionsmediums auf eine Lösung, bestehend aus Blutserum und leukozytendepletiertem Erythrozytenkonzentrat, von essenzieller Bedeutung: Die Herstellung des Blutserums aus mit Natriumcitrat 3,8 % (1:10) antikoaguliertem Vollblut, gewonnen aus deutschen Landrasseschweinen, begann mit der Hinzugabe einer dem Natriumcitrat äquivalenten Menge an Kalziumchlorid. Das wieder gerinnbare Vollblut wurde nach einer Wartezeit von 30 Minuten bei 3000 G über 15 Minuten zentrifugiert. Das als Überstand vorliegende Serum konnte anschließend entnommen werden. Zur Reinigung von weiterhin vorliegenden Zellen und Zellresten erfolgte eine weitere Zentrifugation, sowie die Filtrierung über Edelstahlfilter. Das fertige Blutserum konnte bei -50 °C gelagert werden. Die Gewinnung von Erythrozytenkonzentrat erfolgte entsprechend der Herstellung des Basisperfusionsmediums. Mit dem Ziel der Verringerung einer autoimmunen Entzündungsreaktion bei der Leberperfusion wurde die Herstellung des Erythrozytenkonzentrats durch eine Leukozytendepletion über Leukozytenfilter ergänzt. Das Perfusionsmedium erhielt die SAM^b (Tabelle Nr. 4). Das Vorliegen eines gerinnungsfreien Mediums konnte über die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität sichergestellt werden. Die Verfälschung der Gerinnungsanalyse wurde durch die Gabe einer dem Heparin äquivalenten Menge (1:1) von Protaminsulfon® in die Analyseproben verhindert.

2.9.6. Intraoperative Normotherme Leberperfusion

Die Problematik einer sehr langen ischämischen Phase während der Hepatektomie bei der Verwendung von DCD-Spenderlebern wurde bereits nach der Durchführung der Vorversuche deutlich. Eine intraoperative Perfusion mit einem oxygenierten Medium über die Pfortader, wie in E1-NLP-SK und SVR1, zeigte einen möglichen Lösungsweg auf. Die verwendete Flussrate mit durchschnittlich $0,73 \pm 0,15$ l/h erwies sich aber als zu gering, sowohl zur Verhinderung einer Blutstase als auch für eine ausreichende Oxygenierung. Mit dem Ziel einer Reduktion der Ischämie, einem durchgängig erhaltenen Blutfluss und dadurch einer Verringerung des ischämischen Reperfusionsschadens, wurde ein mobiles Leberperfusionssystem für die intraoperative Anwendung entwickelt (Abbildung Nr. 28 und 29). Dabei enthielt das mobile Perfusionssystem die gleichen Standardelemente, wie das stationäre Leberperfusionssystem: Eine physiologisch oxygenierte, duale arterielle und portale Leberperfusion und einen druckregulierten venösen Rückfluss. Die Aufzeichnung erfolgte über implementierte Fluss- und Druckmesssonden mit einem geschriebenen DasyLab-Programm und die Regulation über die manuelle Einstellung von Druckventilen. Eine Zentrifugalpumpe (*Jostra (Maquet) Rotaflow Console®; Rotaflow RF-32®*) diente als Antrieb des Blutflusses. Die Oxygenierung wurde über einen mit einer Gas- und Gasaufbereitungsflasche verbundenen Oxygenator (*MiniLungKit®*) sichergestellt. Der Anschluss eines Wärmeaustauschers (*Astotherm® plus*) an das Perfusionssystem erhielt eine normotherme Temperatur des zirkulierenden Mediums. Ein unabhängiger Transformator (*reVolt®*) diente als Stromquelle. Durch die Mobilität des Systems und dessen Konstruktionsweise konnte die Leber nach dem Transport, unter laufender Perfusion, mit beibehaltenem Reservevolumen in das stationäre System eingebracht werden.

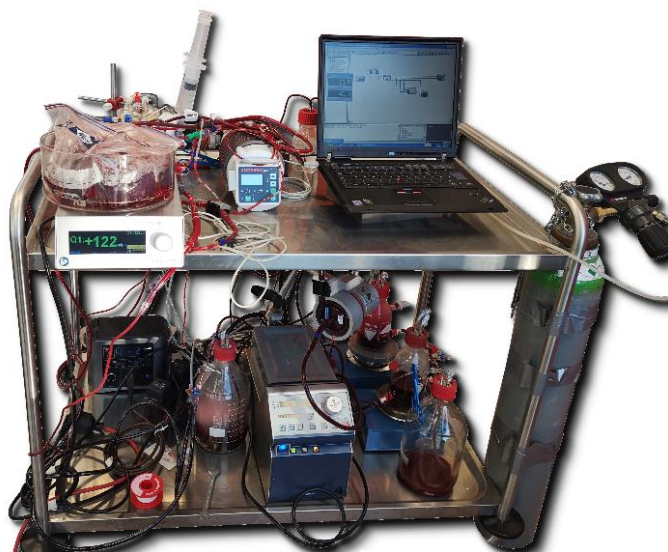


Abbildung Nr. 28: Mobiles Leberperfusionssystem (129)

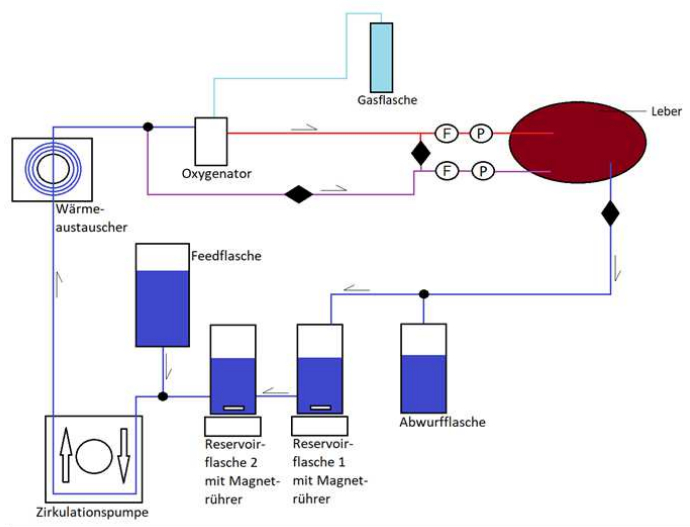


Abbildung Nr. 29: Strukturzeichnung Mobiles Leberperfusionssystem

2.10. Zweite Standardversuchsreihe (SVR2)

2.10.1. Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Versuchsreihe lag bei der Vermeidung, sowohl der in SVR1 nachgewiesenen Blutstase als auch einer ischämischen Reperfusionsschädigung durch die Verwendung einer intraoperativen Normothermen Leberperfusion und einer Modifizierung des stationären Leberperfusionssystems.

2.10.2. Versuchsdurchführung

Die Grundlagen des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung der dualen portalen und arteriellen Leberperfusion basierten weiterhin auf dem Basisversuchsaufbau sowie der Basisdurchführung. Die für die SVR1 etablierten Elemente einer physiologisch simulierten Leberbewegung über das Zwerchfell, ein Filtersystem mit Wasserschloss, eine Dialyse und eine parenterale Nährstoffzufuhr, wurden für die stationäre Leberperfusion beibehalten (129). Der Verhinderung einer entstehenden Blutstase sowie einer allgemeinen Optimierung der Leberperfusion dienten die Implementierung einer

Zentrifugalpumpe als einziger Perfusionsantrieb mit einer physiologischen Oxygenierung von A. hepatica und V. portae, die Regulation von Blutdruck und -fluss über Druckventile und Druck- und Flusssonden und die Erhöhung der Gaszufuhr innerhalb des Oxygenators zur vermehrten CO₂ Entfernung aus dem Zirkulationskreislauf. Die Umstellung des Perfusionsmediums für die intraoperative als auch die postoperative Leberperfusion auf ein leukozytendepletiertes Medium aus Erythrozytenkonzentrat und Blutserum hatte selbiges Ziel (129). Zur antimikrobiellen Prophylaxe erhielten das Perfusionsmedium, sowie das während des Versuches hergestellte Dialysat und die parenterale Ernährung SAM^b (Tabelle Nr. 4).

Die Hepatektomie entsprach in den Grundzügen der Basishepatektomie, unter Hinzunahme der in SVR1 etablierten operativen Befestigung der Bewegungsplattform für die simulierte Zwerchfellbewegung. Nach der Katheterisierung der V. portae mit einem Nelaton-Katheter® (ø 4,67 mm), sowie der infraheptischen V. cava inferior mit einem großlumigen Katheter (ø = 7,3 mm) und der Legierung der supraheptischen V. cava inferior, konnte mit der intraoperativen Perfusion der Leber über die V. portae und dem Abfluss über die V. cava inferior gestartet werden (129). Die Anordnung des Versuchsaufbaus, sowie die Einstellung über die eingebrachten Druckventile, ermöglichte hier bereits eine Perfusion mit einer physiologischen Oxygenierung. Eine venöse Druckeinstellung mit den Zielwerten zwischen -5 und +10 mmHg konnte bereits intraoperativ durchgeführt werden. Um das leukozytendepletierte Perfusionsmedium aus Erythrozytenkonzentrat und Blutserum nicht mit dem innerhalb der Spenderleber befindlichen Blut des Spendertieres zu verfälschen, wurde der erste aus der Leber perfundierte Liter in eine Abwurfflasche abgeführt. Im weiteren Operationsverlauf erfolgte direkt im Anschluss die Kanülierung der A. hepatica sowie deren Anschluss und die Perfusion über das Perfusionssystem (129). Bei der Perfusion konnte ebenfalls bereits intraoperativ eine physiologische Oxygenierung des Perfusionsmediums durchgeführt werden. Die Kanülierung der A. hepatica wurde mit der modifizierten Knopfkanüle, mit dem für die Arterie größtmöglich verwendbaren Durchmesser durchgeführt. Nach bestehendem arteriellem und portalem Kreislauf konnten die folgenden operativen Schritte der Kanülierung des DHC mit einem Nelaton-Katheter® (ø 4,67 mm), die Lösung von intraabdominellen Verwachsungen der Leber unter Einbehalt der verwachsenen Zwerchfellstrukturen sowie die extrakorporale Präparation der

Leberplattform mit dem Zwerchfell, der Leber in den Leberbeutel und die Einbringung der Leber in das stationäre Leberperfusionssystem, unter laufender Perfusion und Oxygenierung durchgeführt werden. Eine Probengewinnung erfolgte für die Ermittlung der, während der Operation absolut freigewordenen Menge an den Enzymen GOT und GPT [U], unter Berücksichtigung der für die intraoperativ verwendeten Menge an Perfusionsmedium.

Der Zeitrahmen für die postoperative Versuchsdurchführung wurde auf eine 24-stündige Leberperfuionszeit gesetzt. Die Einstellung der simulierten Leberbewegung entsprach einer physiologischen Zwerchfellbewegung von 20 rpm mit einem ca. 2 bis 3 cm großen Höhenunterschied (129). Die Herstellung eines individuellen Dialysats bzw. die Durchführung der Dialyse war für die Korrektur des Mineralstoffhaushaltes, sowie zur Entfernung von Abfallprodukten individuell vorzunehmen. Zum Erhalt der Medikamentenkonzentrationen wurden dem Dialysat die im Medikationsplan aufgeführten Substanzen zugesetzt (*Tabelle Nr. 6*). Die parenterale Nährstoffzufuhr, mitsamt Insulin, TUDCA, Antibiotikum und Antimykotikum, entsprach in der Zusammensetzung der Parenteralen Ernährung und erfolgte mit einer Gabe von 17 ml/h (*Tabelle Nr. 6*) (129). Die weitere Dauermedikation über Perfusoren beinhaltete die Gabe von 1.000 I.E./h Heparin und 0,07 mg/h Epoprostenol (129). Zur weiteren Regulation konnten der Leber die Medikamente Natriumhydrogencarbonat, Kalziumchlorid, Glukose und Humanalbumin zugeführt werden.

Grundlage der Datenanalyse waren stündlich entnommene BGA-Proben aus A. hepatica, V. portae und V. cava inferior, eine dreistündliche Blutentnahme aus dem Leberbeutel und eine vierstündliche Gewinnung von venösen Proben zur laborchemischen Konzentrationsbestimmung im Zentrallabor Universitätsklinikum Tübingen (129). Der portale und arterielle Fluss wurde stündlich dokumentiert [ml/min]. Die histologische Probengewinnung erfolgte entsprechend der SVR1 nach Versuchsbeendigung. Das zeitliche Intervall für die mikroskopische Analyse des Perfusionsmediums lag bei 4 Stunden. Für die Analyse der Mineralstoffe und der zellulären Bestandteile wurde der Durchschnitt aus der mittleren Konzentration von Arterie und Pfortader mit der venösen Konzentration für den Gesamtkreislauf berechnet. Die Standardabweichung bezog sich dabei auf die ermittelten Mittelwerte aus den jeweiligen Gefäßen im Zeitverlauf.

2.10.3. Versuchsergebnisse

Für die SVR2 wurden insgesamt drei Normotherme Leberperfusionen innerhalb des Tertiärkreislaufes mit intraoperativer Leberperfusion durchgeführt (129). Die dafür entnommenen Spenderlebern hatten im Durchschnitt ein Gewicht von $2,69 \pm 0,39$ kg (129). Die für die Hepatektomie benötigte Operationszeit dauerte aufgrund des Mehraufwands der intraoperativen Leberperfusion durchschnittlich $2,32 \pm 0,4$ h. Dabei lag nach $0,17 \pm 0,05$ h der Perfusionskreislauf über das mobile Leberperfusionssystem vor (129). Der intraoperativ gemessene Druck innerhalb der V. portae zeigte einen Mittelwert von $23,27 \pm 5,48$ mmHg und der innerhalb der A. hepatica von $54,04 \pm 18,95$ mmHg bei einem erreichten Blutfluss von $75,44 \pm 36,11$ ml/min in der Pfortader und $44,75 \pm 33,88$ ml/min in der Arterie. Der venöse Druck konnte während der Operation bei $-5,33 \pm 3,69$ mmHg gehalten werden. Der Mittelwert für die postoperative absolute GOT-Aktivität lag bei $1696,35 \pm 1346,35$ U und der für die GPT-Aktivität bei $106,02 \pm 27,11$ U. Hierbei zeigte sich eine Verringerung der GOT-Aktivität innerhalb der Versuchsreihe, mit einem Minimalwert bei E3-NLP-TK von 398,3 U (*Tabelle Nr. 9*).

Tabelle Nr. 9: Basisdaten SVR2; (*Leberperusionszeit)

Versuch	Gewicht [kg]	OP-Zeit [h]	WIT [h]	LP-Zeit* [h]	GOT Post-Op [U/l]	GPT Post-Op [U/l]
E1-NLP-TK	3,14	2,75	0,22	24,27	3086,3	131,6
E2-NLP-TK	2,48	2,25	0,13	24,53	1604,455	77,61
E3-NLP-TK	2,45	1,95	0,16	24,2	398,3	108,85

Die vordefinierte Perfusionsdauer innerhalb des stationären Systems konnte mit einer durchschnittlichen Normothermen Leberperfusion über $24,33 \pm 0,17$ h bei jedem Versuch erfolgreich eingehalten werden. Dabei betrug die innerhalb des Reaktors liegende Temperatur $36,82 \pm 0,68$ °C und die innerhalb der Zirkulation $36,75 \pm 0,25$ °C. Der arteriell gemessene Druck konnte mit durchschnittlich $98,42 \pm 3,76$ mmHg und der portale Druck mit $15,23 \pm 2,89$ mmHg innerhalb des vordefinierten Bereichs gehalten werden. Dabei lagen Blutflüsse von $151,47 \pm 54,02$ ml/min in der Arterie und $125,54 \pm 24,78$ ml/min in der Pfortader vor. Während der Versuchsreihe zeigten sich physiologische pH-Werte innerhalb der A. hepatica von durchschnittlich $7,37 \pm 0,06$ (129). Der pH-Wert in der V. portae betrug $7,28 \pm 0,10$, der in der V. cava inferior $7,23 \pm 0,09$ und der innerhalb des Leberbeutels $7,14 \pm 0,18$ (129). Die pH-Werte lagen damit in einem leicht azidotischen Bereich. Die mittlere Zufuhr von Natriumhydrogencarbonat lag bei $0,24 \pm 0,01$ mol (Tabelle Nr. 10). Die Erhöhung der Gaszufuhr auf 2 bar mit einem Gemisch aus Raumluft und Carbongas führte zu einer künstlich erzeugten Hypokapnie

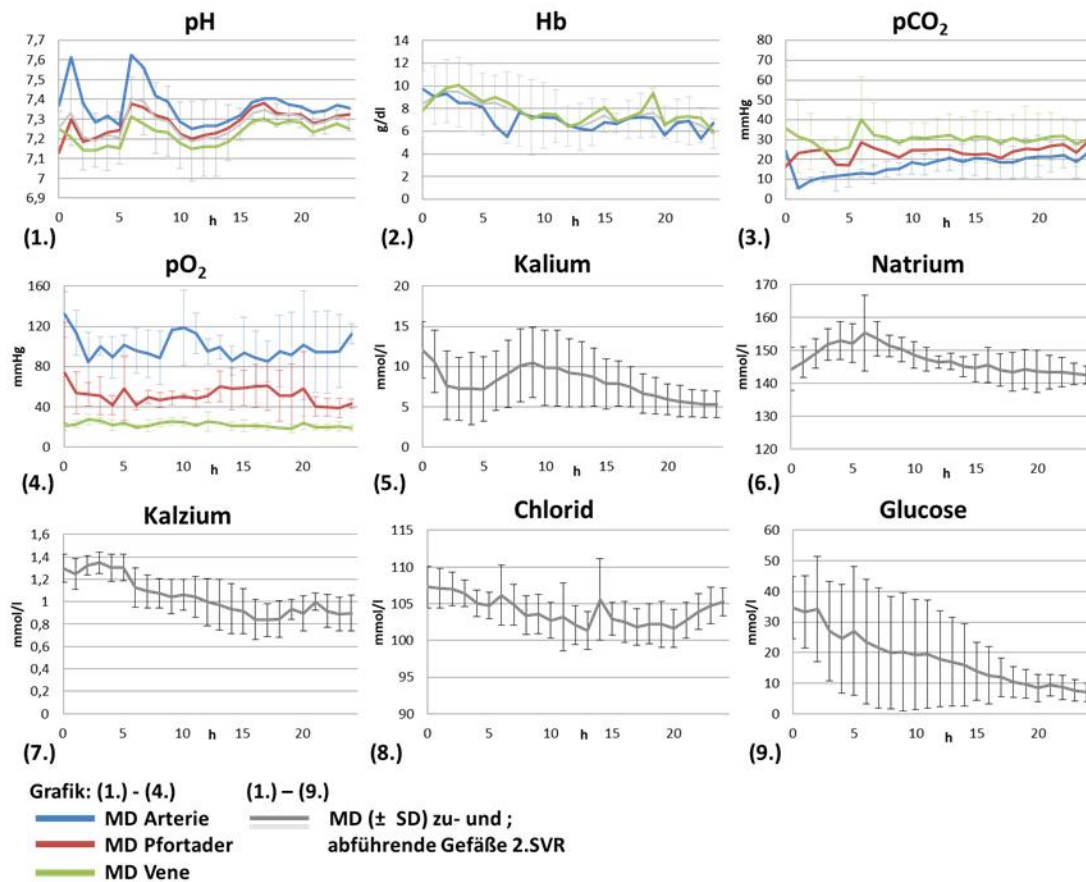


Abbildung Nr. 30: Blutgasanalyse SVR2

mit CO₂-Werten in der Arterie von $17,03 \pm 5,10$ mmHg und in der Pfortader von $23,67 \pm 3,22$ mmHg. In der A. hepatica konnte eine physiologische Oxygenierung mit $99,94 \pm 10,42$ mmHg und in der Pfortader mit $51,88 \pm 4,75$ mmHg gehalten werden. Die in der Vene gemessene CO₂-Konzentration lag im Durchschnitt bei $30,43 \pm 4,53$ mmHg. Nach einer initial erhöhten, postoperativen Kaliumkonzentration von im Mittel $12,08 \pm 3,50$ mmol/l fiel dieser auf eine durchschnittlich minimal erhöhte Konzentration von $8,04 \pm 1,85$ mmol/l. Der Mineralstoffhaushalt von Natrium mit $147,21 \pm 3,86$ mmol/l, Kalzium mit $1,05 \pm 0,17$ mmol/l und Chlorid mit $104,02 \pm 1,84$ mmol/l konnte in einem physiologischen Bereich gehalten werden. Die mittlere Glukosekonzentration lag bei $18,241 \pm 8,50$ mmol/l, wobei diese von einer initial berechneten Konzentration von $34,78 \pm 10,15$ mmol/l während des Versuches auf eine Konzentration von $7,05 \pm 3,05$ mmol/l fiel (*Abbildung Nr. 30*). Die für die Regulierung des Mineralstoffhaushaltes durchgeführten Dialysen mit je einem Liter Dialysat erfolgten durchschnittlich 8 ± 2 -mal. Dies entsprach einer Dialyseperfusion von $0,31 \pm 0,06$ l/h. Die simulierte Leberbewegung über eine Bewegung des Zwerchfells mit 20 rpm und einem vertikalen Bewegungsausmaß von ca. 2 bis 3 cm konnte erfolgreich durchgeführt werden. Während der Versuchsdurchführung produzierten die Lebern durchschnittlich $72,33 \pm 11,24$ ml Gallenflüssigkeit (129). Besonders auffällig war dabei die erhöhte Gallenproduktion von E3-NLP-TK mit 82 ml.

Die Analyse der laborchemischen Proben zeigte eine mittlere GOT-Aktivität von $7437,52 \pm 3737$ U/l und eine GPT-Aktivität von $332,38 \pm 147,20$ U/l (129). Dabei wurde entsprechend der unterschiedlichen postoperativ gemessenen Enzymkonzentration eine Reduktion der berechneten Aktivitäten im Verlauf der Versuchsreihe beobachtet: Während die berechneten mittleren GOT-Aktivitäten während des ersten Versuches bei $10075,43 \pm 7052,04$ U/l lagen und die des zweiten Versuches bei $9077,14 \pm 3796,15$ U/l bereits sanken, ergab die mittlere GOT-Aktivität im dritten Versuch ein Minimum von $3160,00 \pm 2400,07$ U/l. Parallel dazu zeigte sich eine Reduktion der durchschnittlichen GPT-Aktivitäten mit $489,71 \pm 283,14$ U/l in E1-NLP-TK, $309,42 \pm 102,60$ U/l in E2-NLP-TK und $198,00 \pm 95,70$ U/l in E3-NLP-TK. Die Konzentration von Albumin lag im Durchschnitt bei $1,35 \pm 0,39$ g/dl und die von Harnstoff bei $24,24$ mg/dl. Das für die Leberperfusion hergestellte leukozytendepletierte Medium hatte eine initial stark erniedrigte Konzentration, sowohl der Leukozyten mit durchschnittlich $569,05 \pm 257,97$

Zellen/ μl , als auch der Thrombozyten mit $14,19 \pm 3,59$ Tsd. Zellen/ μl . Dabei war bei beiden Zellreihen eine weitere Reduktion der Konzentration während der Versuchsverläufe zu beobachten. Die Erythrozytenkonzentration konnte mit einem Mittelwert von $3,65 \pm 0,82$ Mio. Zellen/ μl gehalten werden. Im Verlauf des Versuches war eine Reduktion der Konzentration von durchschnittlich $4,88 \pm 1,47$ Mio. Zellen/ μl auf $2,77 \pm 0,59$ Mio. Zellen/ μl zu beobachten. Die Entwicklung der Hämoglobinkonzentration mit $7,55 \pm 1,01$ g/dl und des Hämatokriten mit $22,49 \pm 3,81$ % zeigten sich dazu äquivalent. Durchschnittlich wurde den Lebern $311,67 \pm 322,50$ ml Erythrozytenkonzentrat zugeführt, wobei die EK-Gabe in E3-NLP-TK sich auf 80 ml belief (Tabelle Nr. 10). Von besonderer Bedeutung war, dass bei diesem Versuch die Analyse des vorliegenden Sauerstoffträgers den höchsten Mittelwert von Erythrozyten mit $4,42 \pm 0,94$ Mio. Zellen/ μl , als auch des Hämoglobins und Hämatokrit-Wertes innerhalb der Versuchsreihe verzeichnete (Abbildung Nr. 31).

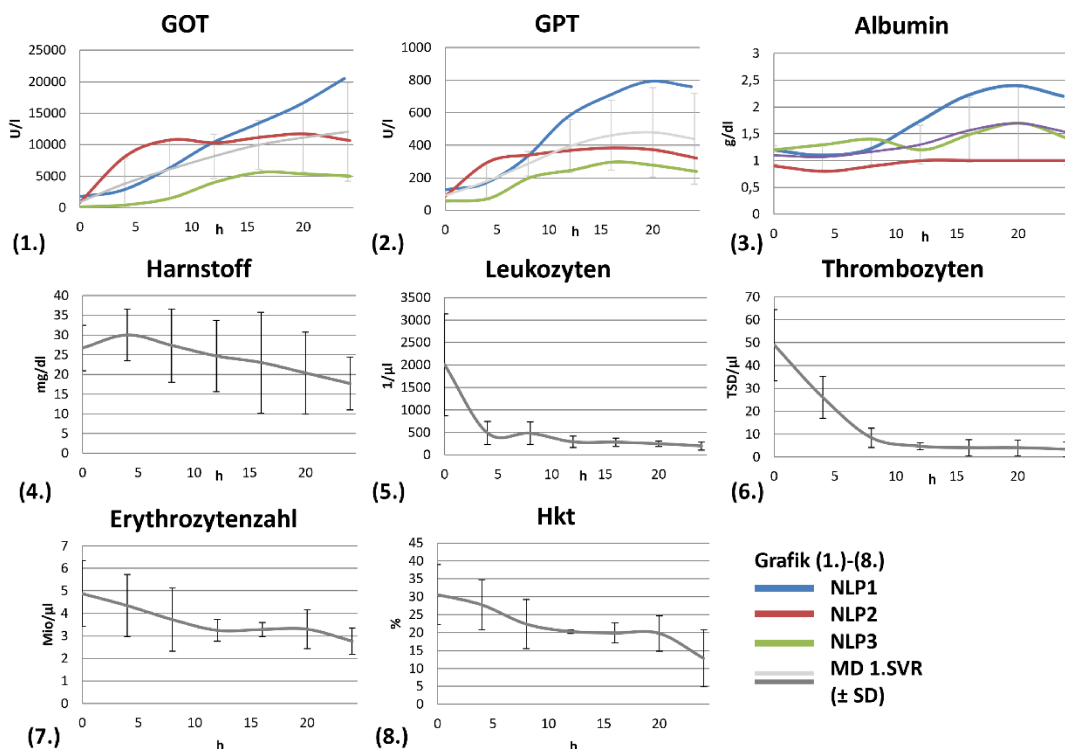


Abbildung Nr. 31: Laboranalyse SVR2 (129)

Makroskopisch stellte sich die Leber weich, homogen und in einer rötlich-braunen Farbe dar. Eine Steuerung der Leberschwellung anhand der Regulation des venösen Drucks konnte beobachtet werden. Während des Versuchsverlaufes zeigten sich keine

Cholestase. In der histologischen Aufarbeitung konnte weitgehend ein zellkernreiches und morphologisch vital aussehendes Gewebe von Leber und Gallenblase nachgewiesen werden. Die strukturelle Gliederung in Leberläppchen blieb erhalten. Eine allgemeine Stauung, ersichtlich über erweiterte Sinusoiden, konnte nicht detektiert werden. Vereinzelt zeigten sich Areale mit erythrozytären Aggregaten innerhalb der Sinusoide. Die mikroskopische Analyse des Perfusionsmediums ergab überwiegend ein morphologisch unauffälliges Bild der Erythrozyten. Darüber hinaus konnten auch Erythrozyten mit spinözellulären Ausläufern nachgewiesen werden. Das Vorhandensein einer Pseudoagglutination von Erythrozyten wurde bei keinem der durchgeführten Versuche nachgewiesen (*Abbildung Nr. 32*).

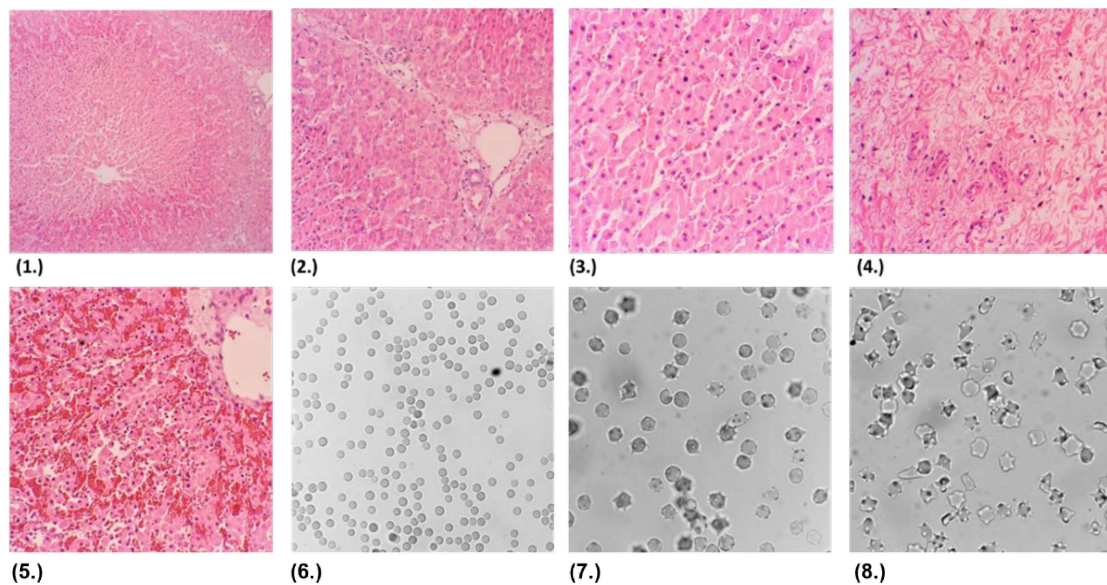


Abbildung Nr. 32: Histologie (H.E.) (1.) – (5.) und Analyse Perfusionsmedium (nativ) (6.) – (8.) SVR2: (1.) L. h. sinister lateralis (4-fach) (129,130); (2.) L. h. sinister lateralis (10-fach) (129,130); (3.) L. h. sinister lateralis (20-fach) (129,130); (4.) Gallenblase (10-fach); (5.) L. h. sinister medialis (10-fach); (6.) Medium (20-fach); (7.) Medium (100-fach); (8.) Medium (100-fach)

Tabelle Nr. 10: Medikamentengabe SVR2

	E1-NLP-TK	E2-NLP-TK	E3-NLP-TK
Erythrozyten-konzentrat [ml]	680	175	80
Heparin [I.E./h]	1.000	1.000	1.000
Insulin [I.E./h]	4	4	4
TUDCA [I.E./3h]	5	5	5
NaHCO ₃ [mol]	0,25	0,23	0,24
CaCl ₂ [mmol]	0	0	0
Albumin [g]	0	0	0
Glucose 20 % [ml]	0	14	0

2.10.4. Versuchsanalyse

In allen Versuchen konnte eine intraoperative Leberperfusion mit anschließender Normothermer Leberperfusion über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt werden. Die Lebern wurde intraoperativ mit einer durchschnittlichen Zeit von ca. 10 Minuten nach Feststellung des kardialen Todes des Spendertiers innerhalb eines Zirkulationskreislaufes reperfundiert und mit Sauerstoff versorgt. Dabei zeigte sich das System im Allgemeinen sehr stabil. Die erhöhten Drücke innerhalb der Pfortader wurden auf eine Manipulation der Leber durch den Operationsprozess und auf das, den Gefäßen umliegende Gewebe während der Operation zurückgeführt. Von erheblichem Vorteil, gegeben durch die bereits intraoperativ gestartete Leberkonservierung, die Mobilität des Systems und die Möglichkeit des Überführens der Leber in das stationäre Leberperfusionssystem unter fortlaufender Perfusion, war ein Arbeiten ohne zeitlichen Druck, wodurch Fehler vermieden werden konnten. Auch während der stationären Leberperfusion zeigte sich diese stabil: Dies war ersichtlich sowohl an der gemessenen Temperatur, den Blutdrücken und -flüssen, als auch an dem pH-Wert und dem Mineralstoffhaushalt. Für die Regulation des pH-Wertes war neben einem stabilen System und einer geringeren Zellschädigung die verbesserte Gaszufuhr von besonderer Bedeutung. Durch die erniedrigte Konzentration des Edukts CO_2 wurde die Reaktion von Wasser mit Kohlenstoffdioxid zu Hydrogencarbonat und Hydronium zugunsten der Edukte verändert, mit dem Resultat eines höheren pH-Wertes. Ersichtlich wurde dieser Effekt bei der Beobachtung des pH-Wertes innerhalb der Pfortader, in der über den eingebauten druckgeregelten Shunt ein Mischblut aus arteriellem und venösem Blut erzeugt wurde. Hier zeigte sich durch eine höhere Konzentration von CO_2 im Vergleich zur *A. hepatica* ein geringerer pH-Wert. Die laborchemische Analyse der Enzyme GOT und GPT spiegelte das innerhalb der Histologie nachgewiesene, erhaltene Gewebe wider. Von ausschlaggebender Bedeutung war dabei der Erhalt einer ausreichenden Menge an Erythrozyten, bzw. Hämoglobin innerhalb des Perfusionsmediums und damit einer erhaltenen Versorgung der Leber mit Sauerstoff. Es zeigte sich zwar eine starke Reduktion der Glucosekonzentration, die auf eine anaerobe Glycolyse schließen ließ, jedoch war diese Reduktion das Ergebnis einer beabsichtigten Filtrierung von Glucose über die Dialyse hin zu einer physiologischen Konzentration. Für den Erhalt der Erythrozytenkonzentration innerhalb des Zirkulationskreislaufes war neben einem

besseren postoperativen Outcome und damit einer Verringerung des ischämischen Reperfusionsschadens, einer Optimierung der Zirkulation innerhalb des stationären Systems mit der Implementierung einer Zentrifugalpumpe, einem optimierten arteriellen Katheter, der Verwendung von Vasodilatoren und einer physiologischen Oxygenierung der arteriellen und portalen Gefäße eine Regulation des venösen Drucks von entscheidender Bedeutung. Die physiologischen Blutdrücke innerhalb der Vene verhinderten ein Kollabieren der venösen Gefäße, wodurch ein Blutrückstau bzw. eine Blutstase mit erhöhten Drücken, zunächst der sinusoidalen und anschließend der Leber zuführenden Gefäße verhindert werden konnte. Neben der histologischen Gewebeanalyse konnte eine Verhinderung der Blutstase durch das Fehlen einer Pseudoagglutination in der mikroskopischen Analyse des Perfusionsmediums nachgewiesen werden. Die zeitweise beobachteten Erythrozyten mit spinozellulären Ausläufern wurden auf eine zwischenzeitig leicht erhöhte Konzentration von Natrium zurückgeführt. Die Optimierung innerhalb der Versuchsreihe, ersichtlich an der laborchemischen Analyse der postoperativen und innerhalb der Leberperfusion gemessenen Enzyme und der erhöhten Konzentration an Sauerstoffträgern, trotz verringerter Erythrozytenkonzentratzufuhr während der Versuchsdurchführung, wurde auf einen Lerneffekt bei der operativen und postoperativen Methodik zurückgeführt.

2.11. Kontrollversuche SCS

2.11.1. Zielsetzung

Die Durchführung von drei Kontrollversuchen diente der Beurteilung der, in SVR2 eingebrachten intraoperativen Intervention, sowie der darauffolgenden Normothermen Leberperfusion.

2.11.2. Versuchsdurchführung

Der Zeitrahmen der Hepatektomie berechnete sich aus der durchschnittlich benötigten Operationszeit der SVR2. Dabei entsprach die Operationstechnik der Basishepatektomie. Die nach der Operation durchgeführte Spülung der Leber mit einer HTK-Lösung (Custodiol®) und eine anschließende Lagerung bei 5 °C wurde anhand der Vorgaben einer

SCS-Leberkonservierung durchgeführt. Die Probengewinnung zur Bestimmung der produzierten Menge an GOT und GPT während der Hepatektomie konnte aus dem durchspülten Medium gewonnen werden. Für einen Vergleich der Kontrollversuche mit der SVR2 wurde die Kultivierungszeit ebenfalls auf 24 Stunden und die Probenentnahme auf ein Intervall von 4 Stunden gesetzt. Um valide Proben für die Analyse der Enzyme zu gewinnen, erfolgte vor jeder Probengewinnung eine 15-minütige Perfusion der Leber über die Pfortader innerhalb eines Kreislaufes mit einem definierten Reservoir an HTK-Medium. Die postoperativ ermittelten absoluten Mengen an freigesetzten GOT und GPT wurden über die verwendete Menge an Medium berechnet.

2.11.3. Versuchsergebnisse

Durch die Verwendung von zwei Minipig-Spenderlebern ergab sich eine Differenz zwischen dem verwendeten Gewebegewicht. Die Umstellung des Spendertieres während der Kontrollversuche wurde aufgrund der 2013 in der *Tierschutz-Versuchstierverordnung* aufgenommenen und erstmalig durch Russel und Rex 1959 veröffentlichten 3R-Prinzipien (*Replacement, Reduction* und *Refinement*) vorgenommen (131): Zum Zeitpunkt der Kontrollversuchsdurchführung bestand die Möglichkeit der Verwendung von Spendertieren einer anderen Versuchsgruppe. Der vordefinierte Zeitrahmen konnte bei jedem Versuch eingehalten werden. Insbesondere die postoperativen absoluten GOT- und GPT-Aktivitäten zeigten sich erhöht. Im Durchschnitt lag die postoperative GOT-Aktivität aller Kontrollversuche bei $1696,35 \pm 1346,35$ U und die GPT-Aktivität bei $106,02 \pm 27,11$ U (*Tabelle Nr. 11*).

Tabelle Nr. 11: *Basisdaten KV-SCS*

Versuch	Gewicht [kg]	OP-Zeit [h]	GOT Post-OP [U]	GPT Post-OP [U]
KV1-SCS	2,11	2,32	3086,3	131,6
KV2-SCS	1,3	2,32	1604,46	77,605
KV3-SCS	1,48	2,32	398,3	108,85

Die SCS-Leberkonservierung erfolgte über den gesetzten Zeitraum von 24 Stunden bei 5°C. Für die Zirkulationsperfusion vor der Probenentnahme wurde im Durchschnitt ein Volumen von $0,43 \pm 0,06$ l verwendet. Während des Versuchsverlaufes stieg die GOT-Aktivität auf einen Wert von durchschnittlich $32392,67 \pm 7255,29$ U/l mit einem Gesamtdurchschnitt von $20548,52 \pm 10132,38$ U/l. Parallel dazu stieg ebenfalls die GPT-Aktivität auf einen Durchschnitt von $1337,67 \pm 85,69$ U/l, bei einer mittleren Gesamtkonzentration von $836,90 \pm 409,52$ U/l (Abbildung Nr. 33).

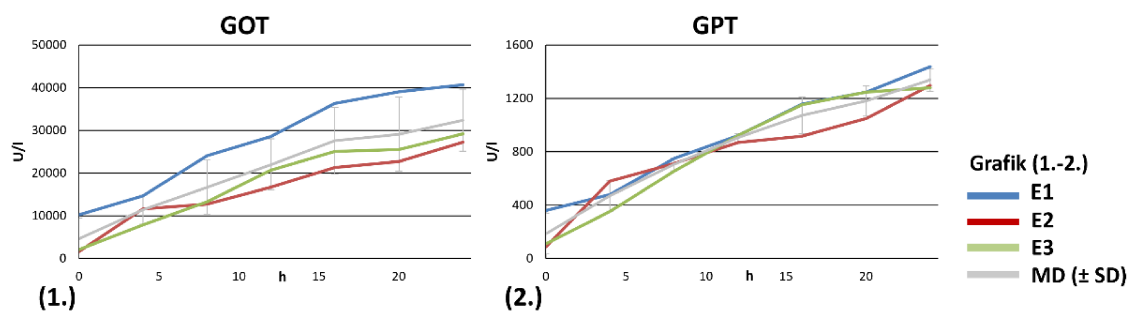


Abbildung Nr. 33: Laboranalyse KV-SCS

2.11.4. Versuchsanalyse

Die Durchführung der Kontrollversuchsreihe konnte unter standardisierten Bedingungen erfolgen. Durch die Verwendung eines deutschen Landrasseschweins und zwei Minipig-Schweinen als Spendertiere war die Vergleichbarkeit der Versuche untereinander eingeschränkt. Die Mittelwerte wurden, bedingt durch ein geringeres Gewebegewicht der Minipig-Schweine, in Richtung von erniedrigten Werten der Leberschädigungsenzyme verschoben. Dies zeigte sich insbesondere in den postoperativ gemessenen Werten. Die erhöhten GOT- und GPT-Aktivitäten während der Leberkonservierung waren Resultat eines, im Vergleich mit dem SVR2, geringer verwendeten Zirkulationsmedius.

3. Ergebnisse

Für die Etablierung eines Normothermen Leberperfusionssystems erfolgten insgesamt dreizehn Versuche (*Tabelle Nr. 12*). Im Ergebnisteil werden die für die Entwicklung durchgeführten Vorversuche aufgrund ihrer Heterogenität in der Versuchsdurchführung nur am Rande aufgeführt. Anhand der mittleren Operationszeit konnte eine Verringerung der benötigten Operationsdauer über die Zeit der durchgeführten Versuche beobachtet werden. Die verlängerte Operationszeit der SVR2 ergab sich durch den Mehraufwand der intraoperativen Intervention. In allen Versuchen konnte über die mikroskopische Analyse des nach der Versuchsdurchführung entnommenen, über 24 Stunden bei 37 °C kultivierten Perfusionsmediums keine Kontamination detektiert werden.

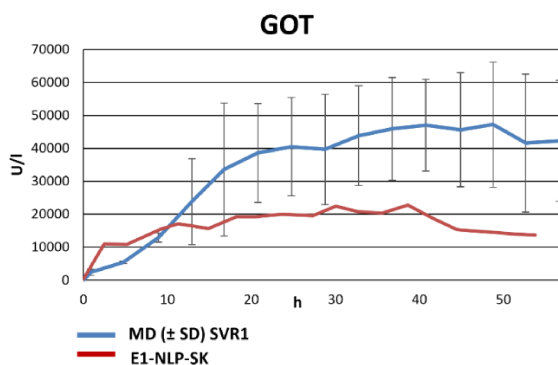
Tabelle Nr. 12: Basisdaten Versuche; (*Leberperfusionszeit)

Versuch	Versuchszahl	Gewicht MD (± SD) [kg]	OP-Zeit MD (± SD) [h]	WIT MD (± SD) [h]	LP-Zeit* MD (± SD) [h]	OP-Zeit mit O ₂ MD (± SD) [%]
VV-NLP-PK	3	1,98 (± 0,56)	1,91 (± 1,11)	-	27,62 (± 27,73)	-
E1-NLP-SK	1	1,72	1,43	-	53,62	-
SVR1	3	1,78 (± 0,09)	1,41 (± 0,28)	-	65,14 (± 13,07)	-
SVR2	3	2,69 (± 0,39)	2,32 (± 0,4)	0,17 (± 0,05)	24,33 (± 0,17)	92,67 (± 1,35)
KV-SCS	3	1,63 (± 0,43)	2,32 (± 0)	-	24 (± 0)	-

3.1. Vergleich E1-NLP-SK und SVR1

Aufgrund des unterschiedlichen Messverfahrens bei der Laboranalyse und des veränderten Leberperfusionssystems war der Vergleich zwischen E1-NLP-SK und SVR1 als eingeschränkt zu werten. Durch die Implementierung des Wärmeaustauschers zeigte sich in der SVR1 eine Optimierung der Temperatur von $33,20 \pm 1,77$ °C in E1-NLP-SK zu durchschnittlich $36,29 \pm 0,53$ °C in SVR1 innerhalb der Zirkulation in Richtung der für die Normotherme Leberperfusion vordefinierten Werte. Hingegen ergab die Analyse der Versuche eine verschlechterte Leberperfusion in der SVR1: Mit einem durchschnittlichen Druck in der Pfortader von $19,49 \pm 5,68$ mmHg in SVR1 lag der Druck zu $69,62 \pm 23,38$ % innerhalb eines definiert akzeptablen Bereichs von 0 bis 20 mmHg,

während in E1-NLP-SK mit einem mittleren Druck von $10,09 \pm 25,87$ mmHg der Druck zu 80,5 % der Leberperfu-sionszeit in einem akzeptablen Bereich lag. Im arteriellen System konnte während der SVR1 ein durchschnittlicher Druck von $250,30 \pm 91,33$ mmHg mit einer Leberperfu-sionszeit von $25,00 \pm 36,14$ % in einem Bereich von 60 bis 160 mmHg und in E1-NLP-SK mit $112,88 \pm 68,52$ mmHg in einer akzeptablen Leberperfu-sionszeit von 65,18 % gehalten werden. Die graphische Darstellung der ermittelten GOT-Aktivitäten spiegelte die makroskopischen Beobachtungen einer in allen Versuchen vorliegenden Leberstauung mit einer hypertrophen Schwellung des Lebergewebes sowie einer verhärteten Leberkapsel wider (*Abbildung Nr. 34*). Parallel zum GOT-Verlauf zeigte sich in E1-NLP-SK eine Reduktion der Leberstauung mit einer stabilen Enzymkonzentration, während sich das Gewebe innerhalb der SVR1 nicht



erholte und einen weiteren Anstieg der GOT-Aktivität verzeichnete. Die Analyse der Gallenproduktion war für SVR1 mit $0,18 \pm 0,01$ ml/h im Vergleich zu E1-NLP-SK mit $0,19$ ml/h nur leicht reduziert.

Abbildung Nr. 34: Laboranalyse E1-NLP-SK und SVR1

3.2. Vergleich Sekundäres und Tertiäres Leberperfusionssystem

Der Vergleich des Tertiären- mit dem Sekundären Kreislauf erfolgte über den Vergleich von SVR1 mit SVR2. Die Intervention einer intraoperativen Leberperfusion während der Hepatektomie führte zu einer verlängerten Operationszeit von $1,41 \pm 0,28$ h in SVR1 zu $2,32 \pm 0,4$ h in SVR2. Durch die schnelle Reperfusion nach durchschnittlich $0,17 \pm 0,05$ h wurde im Vergleich zur, während der in SVR1 verwendeten Operation die ischämische Phase um ca. 88 % gesenkt.

Allgemein erwies sich das entwickelte Tertiäre Leberperfusionssystem als stabiler. Dies zeigte sich insbesondere bei der Analyse der ermittelten durchschnittlichen Blutdrücke: Während bei SVR2 ein definiert akzeptabler Druck zwischen 0 und 20 mmHg lediglich zu 69,62 % der Zeit vorlag, konnte im Tertiären Kreislauf mit einem Mittelwert von 15,23

$\pm 2,89$ mmHg ein akzeptabler Druck zu $93,45 \pm 2,76$ % des Perfusionszeitraums gehalten werden. Auch die Differenz eines definiert akzeptablen arteriellen Durchschnitts von 60 bis 160 mmHg vergrößerte sich zwischen den Versuchsreihen: Der im Sekundären Kreislauf vorliegende Druck von $25,00 \pm 36,14$ % der Perfusionszeit wurde dabei mit einem Mittelwert von $98,42 \pm 3,76$ mmHg auf einen während der Perfusion akzeptablen Druck von $96,77 \pm 1,48$ % im Tertiären Kreislauf gesteigert.

Die verbesserte Stabilität des Tertiären Systems konnte weiterhin über die Analyse der Blutgase beobachtet werden: Trotz höherer pO_2 -Werte innerhalb der Pfortader und der Arterie bei der SVR1 mit $126,35 \pm 2,32$ mmHg gegenüber den ermittelten Werten der Arterie mit $99,94 \pm 10,42$ mmHg und der Pfortader mit $51,88 \pm 4,75$ mmHg in SVR2 konnten im Sekundären Kreislauf höhere pCO_2 -Werte, sowohl in den zu-, als auch abführenden Gefäßen gemessen werden. Diese lagen in der Vene bei $59,24 \pm 9,20$ mmHg und bei $29,83 \pm 5,39$ mmHg in der Pfortader. Die erhöhte pCO_2 -Konzentration spiegelte sich mit einem azidotischen, schwer einzustellenden pH-Wert, trotz Zufuhr von Natriumhydrogencarbonat-Lösung zur Pufferung, wider: Dieser lag in der SVR1 bei einem berechneten Mittelwert aus Vene und Pfortader bei $6,96 \pm 0,13$ und in SVR2 über einem aus den Mittelwerten der zuführenden Gefäße mit der Vene ermittelten Wert bei $7,28 \pm 0,06$.

Am deutlichsten zeigte sich die verbesserte Systemstabilität bei der Analyse der Konzentration des Sauerstoffträgers: Es wurde eine durchschnittliche Konzentration der Erythrozyten in SVR1 von $0,30 \pm 0,09$ Mio. Zellen/ μ l und in SVR2 von $3,65 \pm 0,82$ Mio. Zellen/ μ l verzeichnet. Über einen T-Test der unabhängigen Mittelwerte konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der im Perfusionsmedium befindlichen Erythrozytenkonzentration der beiden Versuchsreihen errechnet werden.

Die verbesserte Systemstabilität spiegelte sich auch in den Ergebnissen der Laboranalyse wider: Dazu wurde für eine bessere Vergleichbarkeit für SVR1 eine bloße Analyse der ersten 24 Stunden der Leberperfusion vorgenommen. In SVR2 kam bereits während der Hepatektomie das auch im folgenden Leberperfuationsverlauf verwendete Perfusionsmedium zum Einsatz. Daher lag im Gegensatz zu SVR1 bereits zum Startzeitpunkt der stationären Leberperfusion eine Enzym-Konzentration größer null vor. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse über die Berechnung des Enzym-

Konzentrationsverlaufes durch Subtraktion der Enzymstartaktivität mit allen, innerhalb des Versuches gemessenen Enzymaktivitäten. Der dabei errechnete durchschnittliche GOT-Aktivitätsverlauf der SVR1 lag bei $19674,62 \pm 8078,48$ U/l und der von SVR2 bei $7437,52 \pm 3737,92$ U/l. Unter Hinzunahme des durchschnittlich ermittelten Konzentrationsverlaufs über 24 Stunden des Versuches E1-NLP-SK in die Analyse des Sekundären Kreislaufs konnte mit einer im Vergleich erniedrigten GOT-Aktivität von $18339,29 \pm 7116,20$ U/l ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) nachgewiesen werden (129). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0$) zwischen SVR1 und SVR2 zeigte sich ebenfalls über den durchschnittlichen Aktivitätsverlauf von GPT mit $656,09 \pm 58,50$ U/l in SVR1 und $332,38 \pm 147,20$ U/l in SVR2 (Abbildung Nr. 35) (129). Die Steigerung der Gallenflüssigkeitsproduktion auf $2,98 \pm 0,48$ ml/h in der SVR2 wies ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Leistungsfähigkeit der Metabolisierung und damit eines vital arbeitenden Leberparenchyms zwischen den Versuchsreihen auf.

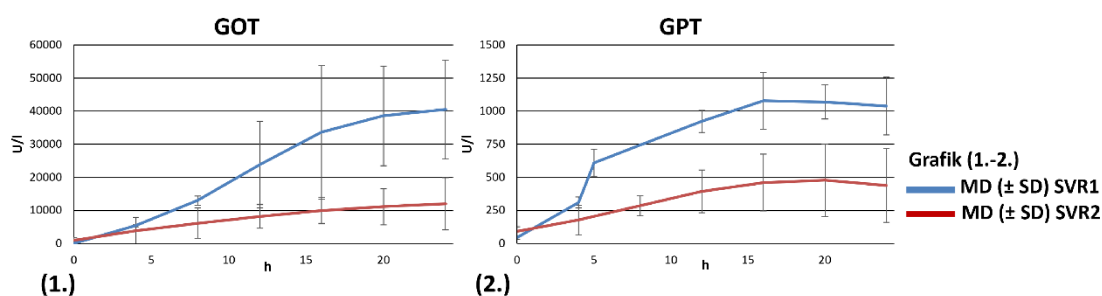


Abbildung Nr. 35: Laboranalyse SVR1 und SVR2

3.3. Vergleich Kontrollversuche

Mit dem Ziel einer besseren Vergleichbarkeit der verwendeten Spenderorgane mit unterschiedlichem Lebergewicht (LG) wurde für die postoperativ berechnete, absolute Menge der Enzyme GOT und GPT die individuell freigewordene Konzentration pro Kilogramm Lebergewicht berechnet [U/kg LG]. Dabei zeigte sich bei der Hepatektomie mit intraoperativer Intervention eine durchschnittliche GOT-Aktivität von $597,48 \pm 412,40$ U/kg LG und eine GPT-Aktivität von $39,21 \pm 6,97$ U/kg LG. Die berechneten Enzymaktivitäten bei den Kontrollversuchen lagen bei $3676,79 \pm 2735,01$ U/kg LG für GOT und $153,68 \pm 75,61$ U/kg LG für GPT. Damit ergab die freigewordene Konzentration der Enzyme pro Kilogramm Lebergewicht bei der Hepatektomie mit

intraoperativer Leberperfusion für GOT eine Reduktion um den Faktor 6,15 und für GPT um den Faktor 3,92 (Tabelle Nr. 13).

Tabelle Nr. 13: Postoperative Enzymkonzentration SVR2 und KV-SCS; (*Lebergewicht)

Versuch	E1-NLP-TK	E2-NLP-TK	E3-NLP-TK	KV1-SCS	KV2-SCS	KV3-SCS
GOT Post-OP [U/kg LG*]	982,90	646,96	162,57	6828,14	1922,22	2280
GPT Post-OP [U/kg LG*]	41,91	31,29	44,43	240,57	102,89	117,57

Für den Vergleich zwischen der in SVR2 und der in den Kontrollversuchen entstandenen Leberschädigung während der Konservierung von 24 Stunden, erfolgte die Berechnung der freigewordenen Enzyme aus dem mittleren Enzymanstieg, unter Einbeziehung des individuell in den Versuchen benötigten Perfusionsvolumens und des jeweiligen Lebergewichts [U/kg LG]:

Bei der SVR2 zeigte sich ein Anstieg der GOT-Aktivität auf einen Maximalwert von $9494,99 \pm 6292,01$ U/kg LG mit einem durchschnittlichen Wert von $5893,27 \pm 3420,19$ U/kg LG. Nach dem maximal durchschnittlich erreichten Spitzenwert von $308,17 \pm 156,44$ U/kg LG nach 16 Stunden fiel die GPT-Aktivität wieder ab. Der Mittelwert lag bei $208,02 \pm 121,59$ U/kg LG.

Im Verlauf der SCS-Leberkonservierung stieg die GOT-Aktivität auf einen Wert von durchschnittlich $8088,18 \pm 987,74$ U/kg LG mit einem mittleren Gesamtdurchschnitt von $4616,57 \pm 546,69$ U/kg LG. Parallel dazu steigerte sich ebenfalls die GPT-Aktivität auf $340,85 \pm 75,25$ U/kg LG bei einem Gesamtanstieg von $193,81 \pm 122,05$ U/kg LG. Damit lagen sowohl die GOT- als auch die GPT-Aktivitäten bei der, in den Kontrollversuchen verwendeten SCS-Leberkonservierung niedriger. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Verfahren in Hinsicht der durchschnittlichen GOT- und GPT-Aktivität nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde für E3-NLP-TK der SVR2 eine deutliche Reduktion sowohl von GOT als auch GPT, insbesondere im späteren Versuchsverlauf, zur mittleren Enzymaktivität der Kontrollversuche beobachtet (Abbildung Nr. 36).

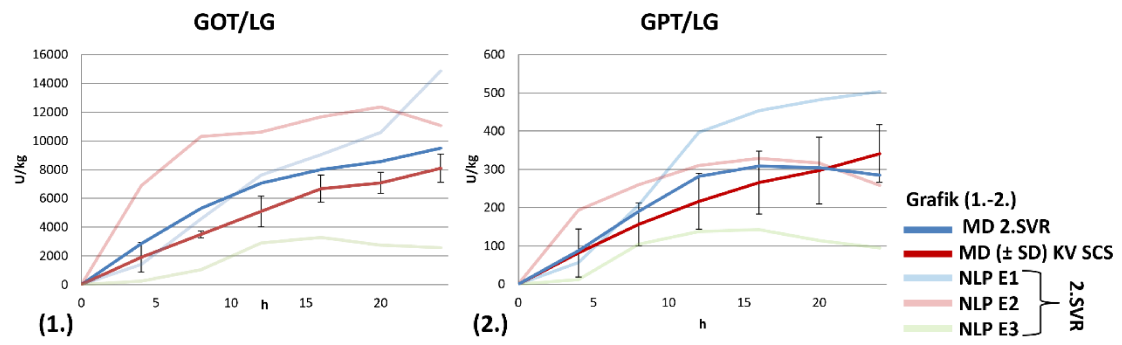


Abbildung Nr. 36: Laboranalyse Kontrollversuche

4. Diskussion

Durch die hohe Mortalitätsrate auf der Warteliste für eine Lebertransplantation und die damit verbundene häufigere Verwendung marginaler Organtransplantate hat sich innerhalb des letzten Jahrzehnts das wissenschaftliche Interesse weg von der statischen Kühlungslagerung, hin zu komplexeren Ansätzen der Organkonservierung verschoben. Dabei bietet das bereits 1967 durch Brettschneider et al. erstmalig durchgeführte Verfahren der maschinellen Perfusion zur Organkonservierung einen potenziell bedeutenden Ansatz (82). Bei den verschiedenen Perfusionsverfahren haben sich im Wesentlichen zwei Methoden durchgesetzt und den Weg in die klinische Praxis der Transplantationsmedizin gefunden: Die hypothermische Maschinenkonservierung mit den Verfahren der HMP, HOPE und D-Hope dient dem gleichen Ziel wie die SCS, der Verlangsamung des Stoffwechsels des Transplantats nach der Spenderentnahme mit dem Resultat einer verkürzten warmen Ischämie und zellulären Schädigung (132, 133). Im Gegensatz zur SCS, wird dies bei der hypothermischen Maschinenkonservierung nicht nur durch eine kälteinduziert herabgesetzte Regulation der enzymgesteuerten Prozesse, sondern ebenfalls durch eine fortlaufende Perfusion und, abhängig vom verwendeten Verfahren, durch eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff erzielt (132, 133). Im Vergleich zur SCS wurden dem Verfahren der hypothermen Maschinenkonservierung mehrere protektive Effekte zugesprochen, zu denen eine Reduktion der Schädigung des Sinusoidalendothels, der Expression proinflammatorischer Zytokine, der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und der Migration von Immunzellen gezählt werden (132, 133). Seit der klinischen Einführung der hypothermischen Maschinenkonservierung mit dem Verfahren der HMP durch Guarrera et al. konnten durch bahnbrechende Studien nicht nur die Durchführbarkeit der MP innerhalb des klinischen Settings, sondern auch bessere Transplantationsergebnisse erzielt werden (110, 113, 114). Dies äußerte sich unter anderem durch eine Reduktion der postoperativen Transaminasenspitzenaktivitäten, der Krankenhausaufenthaltsdauer, des Auftretens biliärer Komplikationen und Allotransplantatdysfunktionen sowie durch eine sehr guten 1-Jahres Transplantat- und Patientenüberlebensrate (110, 113, 114). Die für die maschinelle Konservierung verwendete Perfusionszeit überstieg dabei in der Regel die der SCS-Konservierung (110, 113, 114). Darüber hinaus konnten marginale Spendertransplantate, die zuvor abgelehnt

wurden, erfolgreich mit sehr guten Ergebnissen transplantiert werden, wodurch eine direkte Vergrößerung des Spenderpools erzielt werden konnte (111).

Das zweite, sechs Jahre später durch Ravicumar et al. in die Klinik eingeführte Verfahren der MP ist die Konservierung über die NLP (90). Im Gegensatz zur hypothermischen Maschinenkonservierung wird hier auf den Gebrauch einer gekühlten Lagerung und Perfusion verzichtet und es werden normotherme physiologische Temperaturen angestrebt, wodurch ein physiologischer Stoffwechsel, sowie die Leberfunktion erhalten bleiben (90). Der Wirkmechanismus der NLP konnte bis dato noch nicht vollständig geklärt werden (134). Eine Erklärung für die erfolgreiche Funktionsweise ist, dass die Perfusion zum Erhalt eines gesunden Endothels beiträgt und die Wiederauffüllung der Energiezufuhr durch Adenosintriphosphat verstärkt (134). Dies konnte in einer experimentellen Studie am Tiermodell bestätigt werden, bei der sich der ATP-Spiegel von Lebern, die eine sequenzielle warme und kalte Ischämie erfuhren, nach einer kurzen Phase der NLP auf 80 % des Ausgangswertes erholte (134). Eine weitere Erklärung des Wirkmechanismus kann in einer unterschiedlichen Genexpression der Leber nach SCS im Vergleich zur NLP liegen (135). In der Studie um Jassem et al., bei der 12 NMP- mit 27 SCS-konservierten Lebern verglichen wurden, konnte in der NLP-Gruppe eine Hochregulierung der Gene, die an der Entzündungskontrolle und Geweberegeneration beteiligt sind und eine Inaktivierung der Gene mit einer pro-inflammatorischen und proapoptotischen Funktion, wie Interferon-Gamma und Interleukin-17, beobachtet werden (135).

Genauso wie bei der hypothermischen Maschinenkonservierung wurde bei der NLP die Durchführbarkeit im klinischen Setting, eine Reduktion der postoperativen Transaminasenaktivitäten und das geringere Auftreten einer EAD nachgewiesen (118). In der multizentrischen Studie um Nasralla et al. war dabei eine erniedrigte Transplantatschädigung sowie verringerte Raten verworfener Spenderorgane in der Gruppe mit NLP im Vergleich zur SCS zu beobachten (119). Ebenfalls auffällig war die bei der NLP im Gegensatz zu dem SCS-Verfahren verlängerte Konservierungszeit (119). Ein Unterschied in der Dauer des Krankenhausaufenthalts, dem Auftreten biliärer Komplikationen und Transplantatüberleben im Vergleich zur SCS konnte jedoch nicht festgestellt werden (117-119). Die statistische Analyse durch MacConmara et al., die sich mit der klinischen Auswirkung der NLP im Zeitraum 2016

bis 2019 innerhalb der USA anhand der Daten des United Network for Organ Sharing beschäftigte, zeigte auf, dass in diesem Zeitraum mit 30.596 Spendertransplantaten Verstorbener unter ein Prozent durch NLP konserviert wurden (136). Die durch NLP erhaltenen Organe wiesen dabei mit einer Ausschlussrate von 3,5 % einen signifikant erniedrigten Prozentsatz an verworfenen Transplantaten auf, im Vergleich zu 13,3 % bei der verwendeten SCS-Technik (136).

Die meisten derzeit publizierten klinischen Studien gehen dem Vergleich zwischen den einzelnen Maschinenperfuisionsvarianten und dem derzeit als Goldstandard verwendeten Verfahren der SCS nach. Darüber hinaus sorgt die Verwendung einer heterogenen Gruppe von Allotransplantaten marginaler Spender mit unterschiedlich definiert und gebrauchten ECD-Kriterien und Maschinenperfuisionsprotokollen für einen erschwerten Vergleich der MP-Verfahren. Eine elementare Unterscheidung der beiden Verfahren liegt jedoch in deren Anwendbarkeit und dementsprechend in deren Indikation: Während die Konservierung durch hypotherme Temperaturen gezielt den Vorteil einer reduzierten Stoffwechselfunktion nutzt, um eine möglichst organschonende Leberkonservierung zu erwirken, ist eine erhaltene Stoffwechselfunktion während des Prozesses des Perfuisionsverfahrens das Ziel der NLP und bietet das Potential für weitere Interventionen. In diesem Zusammenhang ist ein derzeit mit großem Interesse betriebenes Forschungsgebiet die Beurteilung von marginalen Spenderorganen innerhalb des diagnostischen Fensters der NLP mit dem Ziel potenziell schlechtere Transplantate mit der Gefahr postoperativer Komplikationen zu detektieren und darüber hinaus Organe, die zuvor als nicht transplantabel eingestuft wurden, auf ihre Qualität zu prüfen. Die erste durchgeführte Transplantation eines als nicht transplantationsfähig eingestuften Organs nach NLP wurde durch Perera et al. erfolgreich durchgeführt (137). Die dabei verwendeten Beurteilungskriterien sahen eine Laktatkonzentration von unter 2 mmol/l und eine vorhandene Gallenproduktion nach zwei Stunden vor (137). Die klinische Studie, publiziert von der Gruppe um Mergental et al., bestätigte die Machbarkeit der Transplantation von durch NLP wiederbelebten aussortierten Spenderorganen (138). Sie berichtet von fünf durchgeführten Transplantationen mit Spenderorganen, die zuvor aufgrund einer zu langen WIT und schlecht ausgefallenem Leberfunktionstest abgelehnt wurden (138). Das während der NLP durchgeführte Bewertungsprotokoll beinhaltete die Laktatkonzentration, die Gallenproduktion, den Gefäßfluss und das Aussehen der Leber

(138). Die transplantierten Lebern präsentierten sich unmittelbar postoperativ funktionsfähig, ebenso bei der Nachuntersuchung nach 7 Monaten (138). Mergental et al. schlugen anhand einer Studie ausrangierter Lebern die Erweiterung der Lebensfähigkeitskriterien, zusammengesetzt aus der Laktatclearance, pH-Erhaltung, Gallenproduktion, vaskulären Flussmustern und dem makroskopischen Erscheinungsbild, vor (100). Weitere Biomarker, die derzeit auf die Fähigkeit einer diagnostischen Aussage der Leberfunktion und das postoperative Auftreten von Komplikationen überprüft werden, sind beispielsweise miRNAs, Zytokine und Peptidhormone, wie das Endothelin-1 (102, 104, 107).

Ein entscheidender Nachteil der NLP ist die erhöhte Gefahr der gerätbedingten Transplantatverluste im Gegensatz zu kältebasierten Verfahren (80). Jede Fehlfunktion, die eine Reduktion des arteriellen und portalen Perfusatflusses bedingt oder die Sauerstoffzufuhr über den Oxygenator stört, hat eine direkte warme Ischämie zur Folge, während bei den hypothermischen Perfusionen das Transplantat weiterhin die Auswirkungen der SCS-Konservierung erfährt (80). Darüber hinaus ist die Perfusion mit normothermen Geräten meist mit einem höheren Aufwand in Bezug auf finanzielle Mittel und Personal verbunden (80).

Ein bereits klinisch getestetes Verfahren, das sowohl den Vorteil der hypothermischen Maschinenkonservierung, einer sicheren Gewebserhaltung, als auch den Vorteil der NLP, einer Transplantatbeurteilung verbindet, ist das kombinierte Verfahren der Kontrollierten Oxygenierten Wiedererwärmung (122). Dies durch Hoyer et al. in die klinische Praxis eingeführte und durch mehrere Studien bestätigte Verfahren zeigte dabei eine Überlebensrate nach 3 bzw. 5 Jahren von bis zu 100 % bzw. ca. 94 % (122-124).

Allgemein lässt sich sagen, dass die MP bereits nachweislich den Pool an Spenderorganen erweitern konnte. Grund dafür war beispielsweise eine direkte Vergrößerung des Spenderpools durch den Gebrauch marginaler Spenderorgane, die zuvor abgelehnt, jedoch durch Reevaluation während des Prozesses der NLP nachgewiesen als transplantabel einzustufen waren (121). Potenziell können indirekt ebenfalls die sehr guten Langzeittransplantationsergebnisse, die das Auftreten der Indikation einer Retransplantation mutmaßlich senken, dazu beitragen (121). Aufgrund der Tatsache, dass sich die MP immer noch in einer klinisch experimentellen Phase befindet und lediglich

in speziellen Transplantationszentren angewendet wird, kann die Fragestellung eines Effekts der MP, bezogen auf die Sterberate der Warteliste, aufgrund ihres gering ausgeschöpften Potentials nicht beantwortet werden. Eine bereits standardisierte Einführung der NLP bei marginalen Spenderorganen, logistischen Herausforderungen und komplexen Empfängern/-innen erfolgte an der Universitätsklinik Innsbruck und gibt einen neuen Ausblick in die Zukunft (121).

Der Entschluss für das Verfahren der NLP bei der Entwicklung des MP-Systems wurde aktiv gefasst, um in zukünftigen Folgeversuchen über eine bloße Forschung der bestmöglichen Konservierungsmöglichkeit hinauszuwachsen und mit der Möglichkeit an einer stoffwechselaktiven ex situ Leber wissenschaftliche Fragestellungen klären zu können. Dabei war das Ziel eine möglichst einfache und kostengünstige Alternative zu den bis heute kommerziell zu erwerbenden Perfusionssystemen, mit einem vergleichbar hohen Standard zu entwickeln und die nötigen Elemente zu detektieren. Zu den Grundbausteinen eines NLP-Systems gehören eine duale Perfusion von A. hepatica und Pfortader über eine oder mehrere Pumpsysteme, ein Blutreservoir, ein Oxygenator und ein Wärmeaustauscher (139). Grundsätzliche Unterschiede in den kommerziellen Perfusionssystemen zeigen sich in dem Automatisierungsgrad, der Regulierung des Perfusionsflusses (volumen- vs. druckgesteuert), dem verwendeten Pumpsystem, der Art des Flussmusters (kontinuierlich vs. pulsatil), der Kontrolle des Elektrolythaushaltes, der Lagerung der Leber und der Kanülierungsmethode (geschlossener vs. offener Kreislauf) (139). Weitere Fragestellungen ergeben sich bezogen auf das verwendete Perfusionsmedium sowie den Gebrauch von Medikamenten, eine parenterale Nährstoffzufuhr und die Mobilität des Geräts (139).

Die Automatisierung des NLP-Systems, wie beim OrganOx Metra- oder dem Liver4Live-System beschrieben, schafft entscheidende Vorteile während der Durchführung der Perfusion: Durch die Eingabe von Soll-Werten und die gleichzeitige Messung des aktuellen Istzustandes, kann eine sehr genaue Regulation innerhalb eines Systems eingestellt werden (90). Darüber hinaus wird der Perfusionsprozess objektiviert, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb einer Versuchsreihe erreicht, ein menschliches Versagen verhindert und der Personalaufwand reduziert wird (90, 94). Die Komplexität

aufgrund der hohen Anzahl unabhängiger sowie abhängiger Variablen einer NLP, sowie der Wunsch diese aufzudecken und die Notwendigkeit Interventionen direkt im System durchführen zu können, gab Anlass, lediglich eine minimalistische Automatisierung des Systems im Punkt Temperaturkontrolle und pH-Kontrolle vorzunehmen.

Die Regulierung der Perfusion kann entweder druck- oder flussgesteuert sein, wobei theoretisch die flussgesteuerte Perfusion mit der Gefahr einer Hypertonie und möglichen Gefäßschädigungen einhergeht und die druckgesteuerte Perfusion mit einer zu geringen Flussrate für eine ausreichende Oxygenierung des Gewebes in Verbindung gebracht werden kann. Beide Verfahren sind machbar, da sich die beiden Variablen Druck und Fluss proportional zueinander verhalten, was in mehreren Studien belegt werden konnte (140).

Als Antrieb der Perfusion wird im Allgemeinen auf die Verwendung von einem oder mehreren Pumpsystemen zurückgegriffen. Die häufigsten Pumpsysteme sind dabei die peristaltische Rollenpumpe und die Zentrifugpumpe. Beide Pumpsysteme zeigen bei der Verwendung innerhalb eines MP-Systems entscheidende Vor- und Nachteile: Bei der peristaltischen Pumpe wird ein pulsatile Fluss generiert (141). Aufgrund des ähnlichen physiologischen Flusses zur Arterie, scheint der pulsatile Fluss insbesondere bei der arteriellen Perfusion von Vorteil zu sein (141). In einer Studie über die optimale Perfusionsmodalität während des kardiopulmonalen Bypasses konnte nachgewiesen werden, dass die pulsatile Perfusion in Bezug auf den Erhalt der Mikrozirkulation der nicht-pulsatilen Perfusion überlegen ist (141). Dem gegenüber erzeugt die Zentrifugpumpe einen kontinuierlichen Fluss (142). Vorteile gegenüber der peristaltischen Pumpe sind dabei ein, entsprechend der Pfortader physiologischer Fluss, niedrige gerätbedingte Thrombosen und eine geringe Hämolyse durch minimierte Blutstagnation, Reibung und Scherbelastung (94). Der Perfusionsfluss innerhalb des Liver4Live-Perfusionsystems basiert auf der Verwendung von automatisiert gesteuerten Druckventilen und einer Zentrifugpumpe, die über eine Variation in der Rotationsgeschwindigkeit einen pulsatilen Fluss erzeugt (94). Auf diese Weise nutzt das System sowohl die Vorteile einer physiologischen pulsatilen Perfusion als auch die Vorteile einer Zentrifugpumpe aus (94). Der Gebrauch von nur einer Zirkulationspumpe und von Druckventilen zur Generierung von zwei unterschiedlichen

Drucksystemen, die bereits im OrganOx Metra Gerät Verwendung fanden, schafft den Vorteil einer physiologischen Oxygenierung von Arterie und Pfortader über einen Druckventil-gesteuerten Bypass, neben einer Verringerung von Turbulenzen und Scherkräften (90, 94). So kann eine Hyperoxygenierung der Gefäße eine Vasokonstriktion nach sich ziehen und ist bei einer anhaltenden längeren Dauer mit einer verringerten Lebensfähigkeit und Proliferation verbunden (143). Um dies zu vermeiden passten wir unsere Systeme der stationären und mobilen Leberperfusion innerhalb der SVR2 entsprechend mit einer Zentrifugalpumpe, Druckventilen und einem arterio-protalen Bypass zur Generierung einer physiologischen Oxygenierung an und konnten die Ergebnisse einer allgemein besseren NLP bestätigen.

Systeme wie der Liver Assist oder der Cleveland NMP-Kreislauf lagern ihre Organe in einer Schale, in die die Leber über eine offene Hohlvene dräniert (offener Kreislauf) und innerhalb des eigenen Perfusats schwimmt (91, 92). Die Vorteile dieser verwendeten Variante sind die einfache Durchführbarkeit, die Reduktion von Druckschäden durch einen Auftrieb der Leber in der Perfusionsflüssigkeit und die Reduktion der Gefahr eines venösen Rückstaus, ausgelöst durch eine venöse Hypertonie (92). Ein entscheidender Nachteil bei der Technik eines offenen Flusses aus der Hohlvene ist eine mangelnde Fähigkeit zur Regulation des venösen Drucks. Während ein erhöhter Druck innerhalb der V. cava inferior zweifelsfrei einen Rückstau sowie eine Hypertrophie des Organs mit mangelnder Sauerstoffversorgung nach sich zieht, so war ebenfalls durch eine venöse Hypotonie eine Reduktion des Flussvolumens in unseren Versuchen zu beobachten. Wir nehmen an, dass negative Blutdrücke im intrahepatisch venösen Gefäßsystem ein Kollabieren der Gefäße, mit resultierender Stase des Perfusats nach sich ziehen und ein ausreichender Blutfluss nur durch physiologische venöse Drücke aufrecht gehalten werden kann. Es wurden schon früh Versuche unternommen, die Leber ex vivo während der Perfusion möglichst physiologisch zu lagern (144). In der durch Neuhaus und Blumhard publizierten Studie wurde ein Perfusionssystem entwickelt, bei dem die Leber innerhalb einer Perfusionskammer aufgehängt wurde (144). Mit einem sinusförmigen, positiven und negativen Druckprofil wurde eine oszillierende Druckänderung auf das Organ, entsprechend den durch die Atmung variierenden intraabdominellen Drücken, ausgeübt (144). Sie berichten von einer allgemeinen Verbesserung in der Parenchymerhaltung (144). Die Gruppe um Eshmuminov et al. entwickelte, ebenfalls mit

dem Ziel einer physiologischen Lagerung der Leber, das erste System einer simulierten Zwerchfellbewegung (94). Sie erkannten, dass eine unbewegliche Lagerung des Organs, verursacht durch das Eigengewicht der Leber, eine heterogene Perfusion und lokale Drucknekrosen nach sich zieht (94). Dabei lag die Leber auf einer an den Seiten befestigten Silikonmatte, unter der ein Ballon über einen Luftsoszillator eine vertikale Bewegung generierte (94). Über die Analyse des Verteilungsgrades des radioaktiven Tracers 18-Fluordesoxyglukose mit Hilfe eines PET-CTs wiesen sie eine homogene Perfusion und einen erhaltenen Stoffwechsel ohne nichtdurchblutete Bereiche des aufliegenden Parenchyms nach (94). Obgleich die Implementierung dieses Systems in die NLP wegweisend ist und dessen Effektivität unangefochten durch die Studie belegt wurde, geben wir zu bedenken, dass nicht wie in der Studie beschrieben, eine physiologische Bewegung der Leber simuliert wurde. Während der pulmonalen Inspiration und Expiration wird das Zwerchfell vertikal auf und ab bewegt. Dabei liegt die Leber nicht dem Zwerchfell auf, sondern ist an diesem aufgehängt. Dadurch erfährt sie nicht nur eine vertikale Bewegung, sondern wird durch eine direkte Kraftübertragung über die mit dem Zwerchfell verwachsenen Leberanteile bei der Expiration nach oben gezogen und gestreckt. Neben der Bewegung innerhalb des Parenchyms erzielt die Zwerchfellbewegung weiterhin einen hämodynamischen Effekt durch eine Förderung des venösen Rückflusses. Aus diesem Grund haben wir ein System entwickelt, das eine physiologische Leberbewegung über ein simuliertes Zwerchfell generiert. Zur Vermeidung lokaler Drucknekrosen lag die Leber dabei innerhalb eines hypertonen Wasserbads. Während unseres Prozesses der NLP konnten wir einen pulsatilen Rückfluss beobachten. Makroskopisch sowie mikroskopisch konnten innerhalb der in SVR2 durchgeführten Studie keine Nekrosen der dem Wasserbad aufliegenden Gewebeanteile nachgewiesen werden. Eine weitere Überprüfung der Effektivität unserer simulierten Leberbewegung muss jedoch noch durchgeführt werden.

Als Kernelement eines Leberperfusionssystems für eine Langzeitperfusion, aber auch für die Leberperfusion von wenigen Stunden, sehen wir die Implementierung einer Dialysemembran, da diese neben der Entgiftung der im Perfusat befindlichen und von der Leber produzierten Abfallprodukte, eine Kontrolle des Elektrolythaushaltes zulässt (94). In diesem Zusammenhang hat sich insbesondere die Verwendung eines individuell einstellbaren Dialysats bewährt. Bei der Zugabe von Medikamenten in das Dialysat zur

Vermeidung einer durch den Prozess der Dialyse hervorgerufenen Verdünnung, kann die Konzentration auf einem stabilen Niveau gehalten werden, setzt aber einen erhöhten Medikamentenverbrauch voraus. Ebenso ist die Beurteilung der Leber anhand von dialysemembrangängiger Stoffe, wie z.B. Laktat, eingeschränkt.

In der Regel basiert das bei der NLP verwendete Leberperfusionsmedium auf roten Blutkörperchen als Sauerstoffträger, wobei als zusätzliche Komponente zum Erhalt des onkotischen Druckes Kolloidlösungen, wie Gelofusine®, Steen-Lösung® und Humanalbumin oder aus Vollblut gewonnene zellfreie Flüssigkeiten, wie gefrorenes Zellplasma, Anwendung finden (90, 117, 138). Die durch Linares-Cervantes et al. durchgeführte Studie verglich im DCD-Tiermodell die Verwendung von Gelofusine und Steen-Lösung mit dem Gebrauch von Vollblut bei der NLP (145). Dabei zeigte die Studie auf, dass die Steen-Lösung den arteriellen Fluss optimierte, die Marker des Gallengangs reduzierte und die Schädigung von Hepatozyten und des Endothels minderte, während das Gelofusine die Enzymaktivitäten und die Apoptose nach der Transplantation erniedrigte (145). Im Gegensatz zu den anderen Lösungen konnte bei der Verwendung von Vollblut eine physiologischere Gallenflüssigkeit nachgewiesen werden, gemessen an den potenziell prädiktiven Markern Gallen-pH und Gallenglukosespiegel (145). Eine zellfreie Alternative zur erythrozytenbasierten Perfusionslösung stellt ein auf Rinderhämoglobinbasis (HBOC) entwickelter Sauerstoffträger dar (146). In dem von uns in SVR1 verwendeten Perfusionsgemisch aus Erythrozytenkonzentrat und Blutplasma, konnten unter dem Mikroskop erythrozytäre Rouleaux-Formationen nachgewiesen werden. Darüber hinaus ergab die Histologie flächendeckende Bereiche mit sinusoidalen Okklusionen durch Erythrozytenaggregate. Eine Analyse des Mediums zeigte ebenfalls das Vorhandensein von Fibrinaggregaten, trotz ausreichender Heparinzufuhr. Der Prozess der Aggregation von Erythrozyten ist noch nicht vollständig geklärt. Eine gängige Theorie ist das Brückenmodell (147). Es erklärt die Aggregationsbildung durch eine nicht-kovalente Vernetzung von Makromolekülen, wie Fibrinogen oder in vitro mit verschiedenen Polymeren (147). Die im Jahr 2020 veröffentlichte Arbeit von DiRito et al. beschrieb erstmalig die Bildung von erythrozytären Rouleaux-Aggregaten während der normothermen MP marginaler menschlicher Nieren mit resultierenden mikrovaskulären Obstruktionen (148). Dabei stellten sie die Hypothese auf, dass die Entstehung der Aggregate durch die Fibrinogen Produktion des Tubulusepithels zustande

kommt (148). Die Gruppe um Harris et al. untersuchte daraufhin die Leber als größte Produktionsquelle von Fibrinogen, während des Prozesses der NLP (149). Neben dem Vorhandensein der Rouleaux-Aggregate wiesen sie eine Korrelation dieser mit steigenden Fibrinkonzentrationen nach (149). Tingle et al. konnten über Martius-Scarlet-Blue Färbung belegen, dass die erythrozytären Okklusionen innerhalb der hepatischen Sinusoide fibrinreich sind (150). Eine weitere Studie, die die Auswirkungen der Gerinnungsfaktoren auf die Entstehung von Thrombosen untersuchte, wurde durch Haque et al. veröffentlicht (151). Bei dieser Arbeit erhielt das Perfusat der unter NLP konservierten Lebern einen Gewebeplasminogenaktivator, wodurch eine signifikant niedrigere Schädigung des peribiliären Gefäßplexus und Wandstromas erzielt werden konnte (151). Aufgrund unserer Ergebnisse sowie der Resultate der beschriebenen Studien, nahmen wir für die SVR2 einen Perfusatwechsel zu einem leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrat mit Blutserum vor. In der Analyse dieser Versuche konnten keine erythrozytären Rouleaux Aggregate im Perfusat detektiert werden. Ebenso zeigte sich eine Verringerung der in der Histologie beobachteten erythrozytären Okklusionen. Der Gebrauch eines gerinnungsfreien Mediums scheint, ebenso wie die Verwendung von Fibrinolytika, das Auftreten von erythrozytären Aggregaten zu vermindern. Ein entscheidender Nachteil bei der bloßen Verwendung eines gerinnungsfreien Mediums ist, dass durch den erhaltenen und gewünschten aktiven Stoffwechsel die Leber weiterhin Gerinnungsfaktoren produziert, wodurch die gewünschte Okklusionsprophylaxe nur zu Beginn der Perfusion erzielt werden kann. Wir geben weiterhin zu bedenken, dass ebenfalls eine verbesserte Flussgeschwindigkeit dazu beigetragen hat, eine sinusoidale Thrombenbildung zu vermeiden und der multifaktorielle Prozess der Entstehung von Rouleaux-Aggregaten bei der NLP einer weiteren Forschung bedarf.

Wichtige medikamentöse Zusätze, die zur Leberperfusion gebraucht werden und Anlass zur Diskussion geben, sind Heparin, Antibiotika, Elektrolyte, Puffer, Insulin, Glukose und Vasodilatoren (140). Bereits 1975 stellten Starzl et al. die Bedeutung von Insulin als hepatotrophe Substanz fest, indem sie Teile einer Leber mit oder ohne Pankreashormone perfundierten, mit dem Ergebnis einer Atrophie in den zuletzt genannten Versuchen (152). Ähnlich den meisten anderen Perfusionssystemen erfolgte unsere Insulingabe entsprechend eines Perfusionsschemas unter Korrektur, über

ermittelte Blutzuckerkonzentrationen. Eshmuminov et al. gingen in der Entwicklung ihres Systems weiter und integrierten einen automatisierten Regelkreis zur Kontrolle des Glukosespiegels durch mechanische Messung und Injektion von Insulin und Glucagon (94). Auch die positive Wirkung eines aufrecht gehaltenen Stoffwechsels durch eine parenterale Ernährung und die Gabe von Gallensalzen wurde früh im Tiermodell bestätigt und wird von uns als notwendiger Faktor in der NLP gesehen (153, 154). Die Studie von Echeverri et al. verglich die Verwendung der Vasodilatoren BQ123 (Endothelin 1), Epoprostenol (Prostazyklin-Analogon) und Verapamil (Kalziumkanal-Antagonist) (155). Dabei konnten sie die Sicherheit aller Vasodilatoren und deren Effekt durch eine signifikante Reduktion des arteriellen Flusses ohne Gebrauch eines Vasodilatators bestätigen, wobei insbesondere BQ123 und Verapamil zu besseren Ergebnissen in ihren Versuchen führten (155). Aufgrund einer sehr kurzen NLP-Zeit von 3 Stunden sind die Ergebnisse dieser Gruppe insbesondere bei der Durchführung von einer Langzeitperfusion mit Vorsicht zu behandeln.

Nach unserer Meinung setzt die beeindruckende NLP-Maschine Liver4Live der Züricher Forschungsgruppe um Eshmuminov et al. im Bereich der Langzeitperfusion neue Maßstäbe (94). Die Entwickler des Liver4Live-Systems begründen ihren Erfolg durch die Identifizierung und Lösung der fünf Hauptprobleme, Kontrolle des Glukosestoffwechsels, Verhinderung einer Hämolyse, Entfernung von Abfallprodukten, Kontrolle der Perfusatoxygenierung und Stimulation einer Zwerchfellbewegung zur Verhinderung von Drucknekrosen (94). Insgesamt können wir deren Nutzen auf die NLP im Langzeitversuch bestätigen und deren Wirkung einer Leberbewegung auf die Verhinderung von Drucknekrosen um eine hämodynamische Rolle in der NLP erweitern. Darüber hinaus betonen wir neben dem Gebrauch der allgemeinen Grundelemente einer Leberperfusion die Wichtigkeit eines druckgesteuerten venösen Abflusses für die Aufrechterhaltung eines ausreichenden Perfusionsflusses und die Beachtung der Gefahr multipler sinusoidaler Okklusionen durch erythrozytäre Aggregatbildung bei der Verwendung nicht-gerinnungsfreier Perfusionsmedien und verstärkter Eigenproduktion von Fibrinogen.

Der ischämische Reperfusionsschaden ist ein bis heute noch nicht vollständig geklärtes multifaktorielles Phänomen, das mit ungünstigen klinischen Resultaten in Verbindung gebracht wird. Dabei gilt dieser in der Transplantationsmedizin bei ausgedehnten Leberresektionen und orthotopen Transplantationen als unvermeidlich. Insbesondere Transplantate von DCD-Spendern/-innen gelten als gefährdet, da im Gegensatz zur DBD, bei der auf eine direkte kalte Ischämie eine warme Reperfusion im Empfänger folgt, eine zusätzliche Periode der warmen Ischämie in situ im Spender nicht ausbleibt. Im Jahr 1986 entdeckten Murry et al., dass kurze Ischämie- und Reperfusionsphasen am Herzen, entsprechend einer ischämischen Präkonditionierung, einen infarktschonenden Effekt haben (156). Mit dieser bahnbrechenden Entdeckung lösten sie ein großes Forschungsinteresse an der Suche nach therapeutischen Strategien zur Prophylaxe ischämischer Schäden aus. Zu den therapeutischen Interventionen gehören die ischämische Konditionierung, pharmakologische Strategien und Organkonservierungstechniken: Der positive Effekt der ischämischen Präkonditionierung konnte bereits im Jahr 2000 von Clavien et al. in der Leber nachgewiesen werden (157). Es wird angenommen, dass ihre Wirkweise durch die Erzeugung kleiner Gewebsverletzungen mit Freisetzung von Adenosin und L-Arginin erfolgt, wodurch über Adenosinrezeptoren die Systeme der Hämoxigenase und der endothelialen Stickoxid-Synthase aktiviert werden und die Nekrose der Hepatozyten verringert wird (158). Obwohl das Verfahren der Präkonditionierung oder das intermittierende Pringle-Verfahren von einigen Leberchirurgen/-innen routinemäßig eingesetzt wurde, führte das wissenschaftliche Interesse für die klinische Anwendung der ischämischen Konditionierung in den letzten Jahren davon weg und hin zu therapeutischen und dynamischen Konservierungsformen (147). In der pharmakologischen Therapie wurde eine sehr große Anzahl an Medikamenten in präklinischen und teilweise auch klinischen Studien getestet. Darunter fallen beispielsweise volatile Medikamente, wie Wasserstoff, der als Antioxidans durch die Bindung von Hydroxyradikalen wirkt oder Stickstoff, der zum Erhalt der Endothelfunktion und des Gefäßtonus beiträgt (159, 160). Unter den intravenös erforschten Pharmazeutika findet man Antioxidantien, Adenosin-Agonisten, Stickoxid-Agonisten, Endothelin-Antagonisten, neutrophile Inaktivatoren, Anti-Apoptose-Wirkstoffe, Hitzeschockproteine, Nuklearfaktor-Kappa-B-Induktoren, Metabolika,

traditionell chinesische Medikamente und weitere (161). In der Gruppe der Antioxidantien sind insbesondere Alpha-Tocopherol, Ascorbinsäure, Trimetazidin und N-Acetylcystein als Radikalfänger und gegen oxidativen Stress bekannt (162-165). Darüber hinaus werden Medikamente, die über eine Modifikation der Expression von miRNAs wirken, untersucht (166). Obwohl innerhalb der veröffentlichten experimentellen Studien die pharmazeutische Therapie eine positive Auswirkung auf den IRI zeigte, konnte bisher kein größerer klinischer Nutzen nachgewiesen werden, der einen routinemäßigen Gebrauch innerhalb der Klinik rechtfertigen würde (147, 161). Insbesondere bei der Verwendung von DCD-Transplantaten sind die pharmazeutischen Therapiemöglichkeiten aufgrund des fehlenden Herz-Lungenkreislaufs eingeschränkt.

Ein möglicher Ansatz zur Therapie der warmen ischämischen Phase während der Hepatektomie, gerade bei der Verwendung von DCD Transplantaten, bietet das erstmals 1997 in Spanien durch Tabet et al. publizierte Verfahren der Normothermen Extracorporalen Membranoxygenierung (ECMO), bzw. abdominellen Normothermen Regionalen Perfusion (aNRP) (167). Bei diesem Verfahren wird nach erfolgloser Reanimation und Asystolie eine Wiederherstellung der Blutzirkulation über einen extrakorporalen normothermen Kreislauf zur Organerhaltung über die Oberschenkelgefäße eingeleitet (168). Die Überlegenheit der Verwendung der aNRP konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (169, 170). Dabei beruhte die Wirkweise insbesondere auf einem Anstieg des ATP-Spiegels nach der warmen ischämischen Phase und auf einem ischämischen Präkonditionierungseffekt, nachgewiesen anhand der intrazellulären, im Vergleich erhöhten Adenosin-, sowie signifikant reduzierten Xanthinkonzentrationen (169, 170). Die Vorteile der aNRP, eine Verringerung der ischämischen Schäden mehrerer Organe, die Möglichkeit einer in situ Organbeurteilung zur Qualitätsabschätzung und die Umwandlung einer DCD- zu einer DBD- ähnlichen Operation, machen dieses Verfahren sehr attraktiv für die Transplantationsmedizin (168). Bereits jetzt wurde die aNRP in mehreren Ländern, wie beispielsweise in Spanien, Großbritannien, Norwegen, Frankreich, Italien und den Niederlanden zur Erweiterung des Spenderpools routinemäßig eingeführt (168). Ein entscheidender Nachteil bei diesem Verfahren ist eine fehlende individuelle Organversorgung nach Unterbrechung der proprietären Blutversorgung vom extrakorporalen Kreislauf mit resultierender warmer Ischämie. Fondevila et al.

kombinierten das Verfahren der aNRP und NLP im Tiermodell, indem sie nach einer 90-minütigen Asystolie innerhalb der Interventionsgruppe eine einstündige aNRP und vierstündige NLP vor Transplantation durchführten (171). Im Vergleich zu einer nach der Asystolie durchgeführten SCS mit 0 % und einer Kombination aus aNRP und SCS mit 83 % zeigte die Interventionsgruppe eine Fünf-Tage-Überlebensrate von 100 % (171). Zwischen den Verfahren der aNRP und NLP infundierte die Gruppe eine kalte Konservierungslösung und leitete dabei eine kalte ischämische Phase ein (171). Die erste völlig ischämiefreie Hepatektomie wurde von der Forschungsgruppe um Zhiyong Guo et al. durchgeführt (172, 173). Basierend auf einem 2017 durchgeführten Einzelversuch zur Reduktion des IRI, publizierte sie im Jahr 2021 eine Studie, bei der die Operation einer Hepatektomie durch eine intraoperative Perfusion ergänzt wurde (172, 173). In dieser Studie wurde die Entnahme von 38 DBD-Spenderlebern miteingeschlossen und ein Vergleich mit 130 kommerziell erfolgten Lebertransplantationen durchgeführt (173). Innerhalb der Interventionsgruppe konnten signifikant niedrigere GPT- und Bilirubin-Spitzenwerte am 7. postoperativen Tag sowie ein besseres Transplantat- und Patientenüberleben aufgezeigt werden (173).

In unserer Versuchsreihe SVR2 konnten wir das Ergebnis der Studie um Zhiyong Guo et al. reproduzieren und den Effekt der Implementierung einer intraoperativen Perfusion während der Hepatektomie zur Minderung des IRI bestätigen. Dies zeigte sich insbesondere in den direkt postoperativ bestimmten GOT- und GPT-Konzentrationen, die im Vergleich mit 6- bzw. 4-fach geminderten absoluten Konzentrationen freigewordener Transaminasen pro Kilogramm Lebergewicht verbunden waren. Kritisch zu bewerten war, dass innerhalb der Kontrollgruppe sowohl Minipig-, als auch deutsche Landrasse Spenderlebern Verwendung fanden, wodurch die Vergleichbarkeit trotz einer Anpassung der Werte an das individuelle Lebergewicht eingeschränkt war. Aufgrund der Tatsache, dass innerhalb der Kontrollversuche die postoperativen Transaminasenaktivitäten geringer ausfielen als bei dem Versuch mit den deutschen Landrasseschweinen, vermuteten wir jedoch einen noch stärkeren Effekt der intraoperativen Leberperfusion. Im Gegensatz zur vergleichenden Studie der Forschungsgruppe um Zhiyong Guo et al. fand ein ausschließlicher Gebrauch von DCD-Spenderlebern ohne Durchführung einer allgemeinen Anästhesie statt (172, 173). Dadurch konnten wir die Machbarkeit einer intraoperativen NLP mit direkt nachfolgendem Übergang in eine stationäre MP ohne

ischämische Zwischenphase sowie deren positive Wirkung auf die Organqualität aufzeigen.

Die Möglichkeit der Konservierung einer ex vivo isolierten und stoffwechselaktiv erhaltenen Leber über einen Zeitraum von sieben Tagen gewährt, neben einem Fenster zur diagnostischen Organbeurteilung, ebenfalls die Möglichkeit der Implementierung therapeutischer Interventionen (94). Die bisher in Tier- und Humanmodellen untersuchten Wirkstoffe umfassen entfettende Substanzen, mesenchymale Stammzellen, entzündungshemmende und gentherapeutische Wirkstoffe. Die Entfettungsmittel sind aufgrund der Korrelation von steatotischen Lebern mit einer höheren Anfälligkeit für IRI von einem besonderen Interesse. Die Forschungsgruppe um Boteon et al. konnte durch eine pharmakologische Optimierung des intrazellulären Lipidstoffwechsels, über die kombinierte Gabe von Medikamenten, den Lipidgehalt in menschlichen Lebern herabsetzen (174). Ihre Intervention der metabolischen Organunterstützung führte ebenfalls zu einer erfolgreichen funktionellen Erholung sowie einer geringeren Expression von Schädigungsmarkern (174). Die Verwendung einer zellulären Therapie (z.B. mit regulatorischen T-Zellen und mesenchymalen Stammzellen) sowie die Behandlung mit aus Zellen gewonnenen Produkten (z.B. extrazelluläre Vesikel) werden aufgrund ihrer immunmodulierenden Wirkung systemisch in der Transplantationsmedizin eingesetzt (175). Die Vorteile der Kombination der zellulären Therapie und NLP liegen in einer lokal organbezogenen direkten Verabreichung, mit einer minimal nötigen Dosierung. Die Forschungsgruppe um Laing et al. untersuchte die Wirkung von, über die Arterie während der NLP verabreichten, multipotenten, adulten Vorläuferzellen an ausrangierten Spenderlebern (176). Die Forschungsgruppe beobachtete eine transendotheliale Migration und Freisetzung mehrerer löslicher Faktoren durch die Vorläuferzellen, die mit einer geringeren systemischen Entzündung nach der Reperfusion in Verbindung gebracht wurden (176). Auch die Therapie über genmodulierende Substanzen während der NLP scheint ein bisher ungenutztes aber potentiell wirkungsvolles Instrument in der Therapie von Lebererkrankungen zu sein (177). Innerhalb einer Tierstudie konnten Goldaracena et al. über die Gabe von Miravirsin während der NLP die miRNA-122 sequestrieren und eine HCV-Replikation verhindern (177). Diese „proof of concept“- Studie zeigt eine mögliche Strategie zur Verhinderung einer HCV-Reinfektion nach Lebertransplantation auf (177). Eine weitere

genmodulierende Therapie, die einen Vorteil bei der Organkonservierung durch NLP bringen kann, ist die RNA-Interferenz, bei der über die Gabe kurzer interferierender RNAs (siRNA) spezifische Gene ausgeschaltet werden, die entzündungsfördernd auf die Entstehung eines IRI wirken (178). Eine erfolgreiche Infiltration der Leber durch siRNA während der NLP konnte durch Gillooly et al. innerhalb eines Tiermodells nachgewiesen werden (178). Damit eröffneten sie einen neuen Weg der Lebertherapie innerhalb der Transplantationsmedizin.

Die Erforschung der extrakorporalen Organerhaltung und deren Implementierung in neue therapeutische Ansätze lässt allerhand Spekulationen für zukünftige Therapieformen innerhalb der Transplantationsmedizin zu. Obgleich schon viele Erfolge innerhalb dieses Gebietes erzielt wurden, kratzen die bisher durchgeführten Studien unter aller Wahrscheinlichkeit nur an der Oberfläche möglicher Interventionen. Bis zum Zeitpunkt einer flächendeckenden, routinierten Implementierung der MP, weg vom Labortisch in die klinische Praxis und bis zur Verwirklichung therapeutischer Verfahren während der Perfusion, sind noch viele Hürden zu nehmen. Dennoch wird nach unserer Meinung die maschinelle Perfusion die Medizin über die Transplantation hinaus beeinflussen und neue Therapieformen von Organerkrankungen im Allgemeinen erschließen.

Auch wenn die Zusammensetzung und Ausführung unseres Perfusionssystems in mancherlei Hinsicht von dem der Züricher Gruppe um Eshmuminov et al. abweicht und auf teilweise einfachere Regulationssysteme eingegrenzt wurde, konnten wir eine stabile Leberperfusion mit erhaltenem Leberparenchym und -funktion durchführen. Die positive Wirkung der für eine Langzeitperfusion beschriebenen notwendigen Elemente einer dualen physiologischen Oxygenierung, die simulierte physiologische Leberbewegung und die Dialyse zur Entfernung von Abfallprodukten sowie zur Elektrolytkontrolle, konnten wir in unserer Versuchsreihe bestätigen. Darüber hinaus möchten wir betonen, dass eine venöse Druckkontrolle zur Aufrechterhaltung der intrahepatischen Mikrozirkulation einen wichtigen Stellenwert bei der Leberperfusion einnimmt. Ebenso zu beachten ist die bestehende Gefahr einer erythrozytären Rouleaux-Bildung bei dem Gebrauch von Perfusat mit Gerinnungsfaktoren und bei der längeren Leberperfusion durch Eigenproduktion. Der Gebrauch einer intraoperativen Normothermen Leberperfusion bietet durch die Möglichkeit einer ischämiefreien Transplantation ohne IRI das Potential, die Transplantationsergebnisse zu verbessern. Die MP und dabei insbesondere das Verfahren der NLP besitzt nicht nur die Fähigkeit einer dringend benötigten Erweiterung des Spenderpools, sondern schafft die Möglichkeit, gezielte Therapien zur Heilung von leberkranken Menschen zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Einleitung

In den letzten Jahren gewann das Verfahren der maschinellen Leberperfusion sowohl für die experimentelle Forschung als auch in der klinischen Praxis zur Erweiterung des Spenderpools stark an Bedeutung, wobei verschiedene, bereits kommerziell erhältliche Systeme Anwendung finden. Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines neuartigen ex vivo Systems mit der Fähigkeit einer Langzeit-Organkonservierung über die Durchführung von Normothermen Leberperfusionen. Darüber hinaus beschäftigt sich diese Arbeit mit der Vermeidung des während der Hepatektomie entstehenden ischämischen Reperfusionsschadens mit dem Ansatz einer Ischämie-freien Lösung.

Material und Methodik

Die Entwicklung des Normothermen Leberperfusionssystems erfolgte über die Durchführung von Vorversuchen (VV-NLP-PK), einem Einzelversuch (E1-NLP-SK) und zwei Standardversuchsreihen (SVR1 und SVR2) innerhalb eines Tiermodells mit deutschen Landrasseschweinen (n = 10). Während die Perfusionszeit innerhalb der SVR2 auf 24 Stunden beschränkt wurde, lag die Kultivierungszeit der übrigen Versuche bei bis zu 72 Stunden. Neben den grundlegenden Elementen einer dualen Perfusion von A. hepatica und V. portae über eine Zentrifugalpumpe, einen Oxygenator, einen Wärmeaustauscher und ein Blutreservoir, enthielt das normotherme Leberperfusionssystem ein Filtersystem mit integriertem Wasserschloss, eine physiologische Oxygenierung der Pfortader über einen arterio-portalen Bypass, eine Dialyse mit individuell einstellbarem Dialysat und eine physiologische über das Zwerchfell generierte Leberbewegung. Das Perfusat bestand aus einem Gemisch aus leukozytendepletiertem Erythrozytenkonzentrat und Blutserum. Die mögliche Entstehung eines Reperfusionsschadens wurde über ein, für den intraoperativen Gebrauch entwickeltes, mobiles Normothermes Leberperfusionssystem mit dem Ziel einer Ischämie-freien Operation bearbeitet. Als Kontrollversuche dienten Leberresektionen ohne intraoperative Intervention und anschließende postoperative Kühlagerung mit der derzeit als Goldstandard verwendeten Kultivierungsmethode Static cold storage (n = 3).

Ergebnisse

Innerhalb der Interventionsgruppe SVR2 mit intraoperativer Leberperfusion und fertigem Perfusionssystem konnte eine stabile Normotherme Leberperfusion von 24 Stunden mit fortbestehender Gallenproduktion durchgeführt werden. Die Perfusionsdaten wie Temperatur, Druck, pO₂, pH, Hb und Mineralhaushalt wurden weitgehend im physiologischen Bereich gehalten. Bei einer Perfusionsmenge von ca. 1 L wurde eine mittlere GOT-Aktivität von 7436 U/L und eine GPT-Aktivität von 332 U/L gemessen. Histologisch konnte ein morphologisch vital aussehendes Lebergewebe nachgewiesen werden. Der Vergleich mit den Kontrollgruppen ohne Intervention und ohne folgende Perfusion ergab eine signifikante Erniedrigung der GOT- und GPT-Aktivitäten ($p < 0,05$). Die Hepatektomie ohne Intervention zeigte postoperativ um das 6-Fache erhöhte GOT- und um das 4-Fache erhöhte GPT-Aktivitäten. Die folgende 24-stündige statische Kühlung ergab keinen signifikanten Unterschied zur Normothermen Leberperfusion.

Diskussion

Die Normotherme Leberperfusion ist schon jetzt ein wichtiges Instrument in der Transplantationsmedizin zur Erweiterung des Spenderpools und zur Entwicklung neuer Therapien in der experimentellen Forschung. Das entwickelte Leberperfusionssystem ermöglichte nachweislich eine stabil durchführbare Perfusion von vierundzwanzig Stunden, wobei verschiedene neu eingebrachte Elemente einen Vorteil zu derzeit kommerziell erhältlichen Systemen aufwiesen. Wie schon in anderen Studien nachgewiesen, ist die intraoperative Leberperfusion möglich und kann den ischämischen Reperfusionsschaden mindern. Insbesondere für die Hepatektomie von Patienten ohne bestehenden Kreislauf bietet diese Intervention das Potential das Transplantatergebnis zu verbessern und den Pool an Spenderorganen zu erweitern.

6. Literaturverzeichnis

1. Embade N, Millet O. Molecular Determinants of Chronic Liver Disease as Studied by NMR-Metabolomics. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017;17(24):2752-66.
2. Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann MJBp, gastroenterology rC. Liver cirrhosis. 2011;25(2):281-90.
3. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9615):838-51.
4. Services USDoHH. Organ Procurement and Transplantation Network National Data: Health Resources and Services Administration, U.S. Department of Health & Human Services 2022 [Available from: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/#>].
5. Stravitz RT, Lee WM. Acute liver failure. *Lancet (London, England)*. 2019;394(10201):869-81.
6. Mamone G, Di Piazza A, Carollo V, Crinò F, Vella S, Cortis K, et al. Imaging of primary malignant tumors in non-cirrhotic liver. *Diagnostic and interventional imaging*. 2020;101(9):519-35.
7. Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz - TPG). Bundesministerium der Justiz. 1997.
8. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2021 Frankfurt/Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO; April 2022 [Available from: <https://dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht%202021.pdf>].
9. Annual Report 2020 The Netherlands: Eurotransplant International Foundation; [Available from: https://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2022/03/ET_AR2020_HR_def.pdf].
10. Grafiken zum Tätigkeitsbericht 2020 Frankfurt/Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation August 2021 [Available from: <https://www.dso.de/BerichteTransplantationszentren/Grafiken%20D%202020%20Leber.pdf#search=Lebertransplantation>].
11. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1963;117:659-76.
12. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Z Bakteriol*. 1900;27:357-62.
13. Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med*. 1981;305(5):266-9.
14. Jachertz N. T. S. Lie: Wegbereiter der Lebertransplantation. *Deutsches Ärzteblatt* 2019;116 (25) A-1245.
15. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. Major problems in clinical surgery. 1964;1:1-85.
16. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973;60(8):646-9.
17. Mishra PK. *Textbook of Surgical Gastroenterology, Volumes 1 & 2*: JP Medical Ltd; 2016.
18. Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, Satomura S, Teng M, Reeves HL, et al. Assessment of liver function in patients with hepatocellular carcinoma: a new evidence-based approach-the ALBI grade. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(6):550-8.

19. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003;124(1):91-6.
20. McDiarmid SV, Anand R, Lindblad AS. Development of a pediatric end-stage liver disease score to predict poor outcome in children awaiting liver transplantation. *Transplantation*. 2002;74(2):173-81.
21. Asrani SK, Kamath PS. Model for end-stage liver disease score and MELD exceptions: 15 years later. *Hepatology*. 2015;9(3):346-54.
22. Sacleux SC, Samuel D. A Critical Review of MELD as a Reliable Tool for Transplant Prioritization. *Seminars in liver disease*. 2019;39(4):403-13.
23. Tautenhahn H-M, Rauchfuß F, Ali Deeb A, Bauschke A, Settmacher UJDC. Lebertransplantation durch Lebendspende. *2020;91(11):926-33*.
24. Biggins SW, Rodriguez HJ, Bacchetti P, Bass NM, Roberts JP, Terrault NAJH. Serum sodium predicts mortality in patients listed for liver transplantation. *2005;41(1):32-9*.
25. Luca A, Angermayr B, Bertolini G, Koenig F, Vizzini G, Ploner M, et al. An integrated MELD model including serum sodium and age improves the prediction of early mortality in patients with cirrhosis. *2007;13(8):1174-80*.
26. Kartoun U, Corey KE, Simon TG, Zheng H, Aggarwal R, Ng K, et al. The MELD-Plus: A generalizable prediction risk score in cirrhosis. *2017;12(10):e0186301*.
27. Montano-Loza AJ, Duarte-Rojo A, Meza-Junco J, Baracos VE, Sawyer MB, Pang JX, et al. Inclusion of Sarcopenia Within MELD (MELD-Sarcopenia) and the Prediction of Mortality in Patients With Cirrhosis. *Clinical and translational gastroenterology*. 2015;6(7):e102.
28. Thakrar SV, Melikian CN. Anaesthesia for liver transplantation. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*. 2017;78(5):260-5.
29. Starzl TE, Iwatsuki S, Esquivel CO, Todo S, Kam I, Lynch S, et al. Refinements in the surgical technique of liver transplantation. *Seminars in liver disease*. 1985;5(4):349-56.
30. Calne RY, Williams R. Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *British medical journal*. 1968;4(5630):535-40.
31. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg*. 1989;210(5):649-52.
32. Schmidt J, Müller S, Mehrabi A, Schemmer P, Büchler MJC. Orthotope Lebertransplantation Technik und Ergebnisse. *2008;79:112-20*.
33. Belghiti J, Panis Y, Sauvanet A, Gayet B, Fékété F. A new technique of side to side caval anastomosis during orthotopic hepatic transplantation without inferior vena caval occlusion. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1992;175(3):270-2.
34. Belghiti J, Noun R, Sauvanet A. Temporary portocaval anastomosis with preservation of caval flow during orthotopic liver transplantation. *American journal of surgery*. 1995;169(2):277-9.
35. Tchilikidi KY. Liver graft preservation methods during cold ischemia phase and normothermic machine perfusion. *World J Gastrointest Surg*. 2019;11(3):126-42.
36. Orug T, Jarufe N, Soonawalla Z, Tekin K, Mirza DF, Mayer D. Back table procedure for the modified piggyback technique of liver transplantation: a simple test to identify caval leaks on the bench. *Exp Clin Transplant*. 2004;2(2):246-8.
37. Levi DM, Pararas N, Tzakis AG, Nishida S, Tryphonopoulos P, Gonzalez-Pinto I, et al. Liver transplantation with preservation of the inferior vena cava: lessons learned through 2,000 cases. *2012;214(4):691-8*.
38. Ming Y-Z, Niu Y, Shao M-J, She X-G, Ye Q-FJH, International PD. Hepatic veins anatomy and piggy-back liver transplantation. *2012;11(4):429-33*.
39. Bismuth H, Houssin DJS. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *1984;95(3):367-70*.

40. Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H. [Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation)--a new method in the further development of segmental liver transplantation]. *Langenbecks Archiv fur Chirurgie*. 1988;373(2):127-30.
41. Bismuth H, Morino M, Castaing D, Gillon MC, Descorps Declere A, Saliba F, et al. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *Br J Surg*. 1989;76(7):722-4.
42. Liu H, Li R, Fu J, He Q, Li JJAoT. Technical Skills Required in Split Liver Transplantation. 2016;21:408-15.
43. Lau NS, Jacques A, McCaughan G, Crawford M, Liu K, Pulitano C. Addressing the challenges of split liver transplantation through technical advances. A systematic review. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2021;35(3):100627.
44. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet (London, England)*. 1989;2(8661):497.
45. Strong RW, Lynch SV, Ong TH, Matsunami H, Koido Y, Balderson GA. Successful liver transplantation from a living donor to her son. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1505-7.
46. Hashikura Y, Makuuchi M, Kawasaki S, Matsunami H, Ikegami T, Nakazawa Y, et al. Successful living-related partial liver transplantation to an adult patient. *Lancet (London, England)*. 1994;343(8907):1233-4.
47. Song GW, Lee SG, Moon DB, Ahn CS, Hwang S, Kim KH, et al. Dual-graft Adult Living Donor Liver Transplantation: An Innovative Surgical Procedure for Live Liver Donor Pool Expansion. *Ann Surg*. 2017;266(1):10-8.
48. Zhou GP, Sun LY, Zhu ZJ. The concept of "domino" in liver and hepatocyte transplantation. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2020;13:1756284820968755.
49. Yen LH, Sabatino JC. Imaging complications of liver transplantation: a multimodality pictorial review. *Abdom Radiol (NY)*. 2021;46(6):2444-57.
50. Kochhar G, Parungao JM, Hanouneh IA, Parsi MA. Biliary complications following liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2013;19(19):2841-6.
51. Deltenre P, Valla DC. Ischemic cholangiopathy. *Seminars in liver disease*. 2008;28(3):235-46.
52. Mehrabi A, Fonouni H, Müller SA, Schmidt J. Current concepts in transplant surgery: liver transplantation today. *Langenbecks Arch Surg*. 2008;393(3):245-60.
53. Hartog H, Hann A, Perera M. Primary Nonfunction of the Liver Allograft. *Transplantation*. 2022;106(1):117-28.
54. Masuda Y, Yoshizawa K, Ohno Y, Mita A, Shimizu A, Soejima Y. Small-for-size syndrome in liver transplantation: Definition, pathophysiology and management. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2020;19(4):334-41.
55. Lladó L, Lopez-Dominguez J, Ramos E, Cachero A, Mils K, Baliellas C, et al. Is Liver Retransplantation Justified in the Current Era? *Cir Esp (Engl Ed)*. 2021;99(5):339-45.
56. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.
57. Rampes S, Ma D. Hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplant setting: mechanisms and protective strategies. *J Biomed Res*. 2019;33(4):221-34.
58. Clarke G, Mergental H, Hann A, Perera M, Afford SC, Mirza DF. How Machine Perfusion Ameliorates Hepatic Ischaemia Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14).
59. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiological reviews*. 2009;89(4):1269-339.
60. Siriussawakul A, Zaky A, Lang JD. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2010;16(48):6079-86.
61. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2012;33(7):829-37.

62. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol.* 1992;52(4):377-82.
63. Fondevila C, Shen XD, Tsuchihashi S, Uchida Y, Freitas MC, Ke B, et al. The membrane attack complex (C5b-9) in liver cold ischemia and reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2008;14(8):1133-41.
64. Bejaoui M, Pantazi E, Folch-Puy E, Baptista PM, García-Gil A, Adam R, et al. Emerging concepts in liver graft preservation. *World J Gastroenterol.* 2015;21(2):396-407.
65. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988;45(4):673-6.
66. Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, et al. Important components of the UW solution. *Transplantation.* 1990;49(2):251-7.
67. Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transpl.* 2006;12(2):226-30.
68. Kaltenborn A, Gwiasda J, Amelung V, Krauth C, Lehner F, Braun F, et al. Comparable outcome of liver transplantation with histidine-tryptophan-ketoglutarate vs. University of Wisconsin preservation solution: a retrospective observational double-center trial. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:169.
69. Stewart ZA, Cameron AM, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL. Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival in deceased donor livers, especially those donated after cardiac death. *Am J Transplant.* 2009;9(2):286-93.
70. Zaouali MA, Reiter RJ, Padriša-Altés S, Boncompagni E, García JJ, ben Abennebi H, et al. Melatonin protects steatotic and nonsteatotic liver grafts against cold ischemia and reperfusion injury. *Journal of pineal research.* 2011;50(2):213-21.
71. Zaouali MA, Bardag-Gorce F, Carbonell T, Oliva J, Pantazi E, Bejaoui M, et al. Proteasome inhibitors protect the steatotic and non-steatotic liver graft against cold ischemia reperfusion injury. *Exp Mol Pathol.* 2013;94(2):352-9.
72. Ben Mosbah I, Casillas-Ramírez A, Xaus C, Serafín A, Roselló-Catafau J, Peralta C. Trimetazidine: is it a promising drug for use in steatotic grafts? *World J Gastroenterol.* 2006;12(6):908-14.
73. Halleck F, Diekmann F. Cross-over Transplantationen—immer (noch) sinnvoll? *Nieren- und Hochdruckkrankheiten.* 2018;47(4):204.
74. Vodkin I, Kuo A. Extended Criteria Donors in Liver Transplantation. *Clin Liver Dis.* 2017;21(2):289-301.
75. Barshes NR, Horwitz IB, Franzini L, Vierling JM, Goss JA. Waitlist mortality decreases with increased use of extended criteria donor liver grafts at adult liver transplant centers. *Am J Transplant.* 2007;7(5):1265-70.
76. Dasari BVM, Schlegel A, Mergental H, Perera M. The use of old donors in liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(2):211-7.
77. de Graaf EL, Kench J, Dilworth P, Shackel NA, Strasser SI, Joseph D, et al. Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(3):540-6.
78. Zhang QY, Zhang QF, Zhang DZ. The Impact of Steatosis on the Outcome of Liver Transplantation: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2019;2019:3962785.
79. Le Dinh H, de Roover A, Kaba A, Lauwick S, Joris J, Delwaide J, et al. Donation after cardiocirculatory death liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2012;18(33):4491-506.
80. Czigan Z, Lurje I, Tolba RH, Neumann UP, Tacke F, Lurje GJL. Machine perfusion for liver transplantation in the era of marginal organs—new kids on the block. 2019;39(2):228-49.

81. MacConmara M, Vagefi PA. Machine Perfusion in Liver Transplantation. *Adv Surg.* 2021;55:175-95.
82. Brettschneider L, Daloz PM, Huguet C, Groth CG, Kashiwagi N, Hutchison DE, et al. SUCCESSFUL ORTHOTOPIC TRANSPLANTATION OF LIVER HOMOGRAFTS AFTER EIGHT TO TWENTY-FIVE HOURS PRESERVATION. *Surg Forum.* 1967;18:376-8.
83. Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *N Engl J Med.* 1968;278(11):608-10.
84. Kamada N, Calne RY, Wight DG, Lines JG. Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation.* 1980;30(1):43-8.
85. Tolboom H, Pouw R, Uygun K, Tanimura Y, Izamis ML, Berthiaume F, et al. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng.* 2007;13(8):2143-51.
86. Pienaar BH, Lindell SL, Van Gulik T, Southard JH, Belzer FO. Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation.* 1990;49(2):258-60.
87. Karangwa SA, Dutkowski P, Fontes P, Friend PJ, Guarrera JV, Markmann JF, et al. Machine Perfusion of Donor Livers for Transplantation: A Proposal for Standardized Nomenclature and Reporting Guidelines. *Am J Transplant.* 2016;16(10):2932-42.
88. Michelotto J, Gassner J, Moosburner S, Muth V, Patel MS, Selzner M, et al. Ex vivo machine perfusion: current applications and future directions in liver transplantation. *Langenbecks Arch Surg.* 2021;406(1):39-54.
89. Ravikumar R, Leuvenink H, Friend PJ. Normothermic liver preservation: a new paradigm? *Transpl Int.* 2015;28(6):690-9.
90. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MT, et al. Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *Am J Transplant.* 2016;16(6):1779-87.
91. Op den Dries S, Karimian N, Sutton M, Westerkamp A, Nijsten M, Gouw A, et al. Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers. *American Journal of Transplantation.* 2013;13(5):1327-35.
92. Nassar A, Liu Q, Farias K, D'Amico G, Tom C, Grady P, et al. Ex vivo normothermic machine perfusion is safe, simple, and reliable: results from a large animal model. *Surg Innov.* 2015;22(1):61-9.
93. Chang DD, Han JJ. The TransMedics Organ Care System for the liver receives FDA pre-market approval. *Artif Organs.* 2022;46(1):25-6.
94. Eshmuminov D, Becker D, Bautista Borrego L, Hefti M, Schuler MJ, Hagedorn C, et al. An integrated perfusion machine preserves injured human livers for 1 week. *Nat Biotechnol.* 2020;38(2):189-98.
95. Warnecke G, Moradiellos J, Tudorache I, Kühn C, Avsar M, Wiegmann B, et al. Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients. *Lancet (London, England).* 2012;380(9856):1851-8.
96. García Sáez D, Zych B, Sabashnikov A, Bowles CT, De Robertis F, Mohite PN, et al. Evaluation of the organ care system in heart transplantation with an adverse donor/recipient profile. *Ann Thorac Surg.* 2014;98(6):2099-105; discussion 105-6.
97. Watson CJ, Kosmoliaptis V, Pley C, Randle L, Fear C, Crick K, et al. Observations on the ex situ perfusion of livers for transplantation. *Am J Transplant.* 2018;18(8):2005-20.
98. Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*: Springer; 2013.
99. Sutton ME, op den Dries S, Karimian N, Weeder PD, de Boer MT, Wiersema-Buist J, et al. Criteria for viability assessment of discarded human donor livers during ex vivo normothermic machine perfusion. *PLoS One.* 2014;9(11):e110642.

100. Mergental H, Stephenson BTF, Laing RW, Kirkham AJ, Neil DAH, Wallace LL, et al. Development of Clinical Criteria for Functional Assessment to Predict Primary Nonfunction of High-Risk Livers Using Normothermic Machine Perfusion. *Liver Transpl.* 2018;24(10):1453-69.
101. Bruinsma BG, Sridharan GV, Weeder PD, Avruch JH, Saeidi N, Özer S, et al. Metabolic profiling during ex vivo machine perfusion of the human liver. *Sci Rep.* 2016;6:22415.
102. Roderburg C, Benz F, Vargas Cardenas D, Koch A, Janssen J, Vucur M, et al. Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver Int.* 2015;35(4):1172-84.
103. Li C, Zhao Q, Zhang W, Chen M, Ju W, Wu L, et al. MicroRNA-146b-5p Identified in Porcine Liver Donation Model is Associated with Early Allograft Dysfunction in Human Liver Transplantation. *Med Sci Monit.* 2017;23:5876-84.
104. Li SP, Wang FF, Zhang WK, Bian MZ, Zhang SY, Yan H, et al. Characteristics of Changes in Inflammatory Cytokines as a Function of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Stage in Mice. *Inflammation.* 2019;42(6):2139-47.
105. Núñez KG, Frank A, Gonzalez-Rosario J, Galliano G, Bridle K, Crawford D, et al. Interleukin-33 / Cyclin D1 imbalance in severe liver steatosis predicts susceptibility to ischemia reperfusion injury. *PLoS One.* 2019;14(4):e0216242.
106. Ye D, Li H, Wang Y, Jia W, Zhou J, Fan J, et al. Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Is A Sensitive Biomarker for Severe Ischemia/reperfusion Injury in Patients with Liver Transplantation. *Sci Rep.* 2016;6:19776.
107. Dorobantu B, Popescu I, Dima S, Nastase A, Iacob S. Molecular Biomarkers as Predictors for Biliary Complications Following Liver Transplantation. A Prospective Study. *J Gastrointest Liver Dis.* 2017;26(3):253-9.
108. Boyd A, Cain O, Chauhan A, Webb GJ. Medical liver biopsy: background, indications, procedure and histopathology. *Frontline Gastroenterol.* 2020;11(1):40-7.
109. Clark I, Torbenson MS. Immunohistochemistry and Special Stains in Medical Liver Pathology. *Adv Anat Pathol.* 2017;24(2):99-109.
110. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ, et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant.* 2010;10(2):372-81.
111. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Reznik E, Musat C, Lukose TI, et al. Hypothermic machine preservation facilitates successful transplantation of "orphan" extended criteria donor livers. *Am J Transplant.* 2015;15(1):161-9.
112. Dutkowski P, Schlegel A, de Oliveira M, Müllhaupt B, Neff F, Clavien PA. HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death. *J Hepatol.* 2014;60(4):765-72.
113. Dutkowski P, Polak WG, Muiesan P, Schlegel A, Verhoeven CJ, Scalera I, et al. First Comparison of Hypothermic Oxygenated PErfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants: An International-matched Case Analysis. *Ann Surg.* 2015;262(5):764-70; discussion 70-1.
114. van Rijn R, Karimian N, Matton APM, Burlage LC, Westerkamp AC, van den Berg AP, et al. Dual hypothermic oxygenated machine perfusion in liver transplants donated after circulatory death. *Br J Surg.* 2017;104(7):907-17.
115. Patrono D, Lavezzo B, Molinaro L, Rizza G, Catalano G, Gonella F, et al. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion for Liver Transplantation: An Initial Experience. *Exp Clin Transplant.* 2018;16(2):172-6.
116. Dondossola D, Lonati C, Zanella A, Maggioni M, Antonelli B, Reggiani P, et al. Preliminary Experience With Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion in an Italian Liver Transplant Center. *Transplant Proc.* 2019;51(1):111-6.

117. Selzner M, Goldaracena N, Echeverri J, Kathis JM, Linares I, Selzner N, et al. Normothermic ex vivo liver perfusion using steen solution as perfusate for human liver transplantation: First North American results. *Liver Transpl.* 2016;22(11):1501-8.
118. Bral M, Gala-Lopez B, Bigam D, Kneteman N, Malcolm A, Livingstone S, et al. Preliminary Single-Center Canadian Experience of Human Normothermic Ex Vivo Liver Perfusion: Results of a Clinical Trial. *Am J Transplant.* 2017;17(4):1071-80.
119. Nasralla D, Coussios CC, Mergental H, Akhtar MZ, Butler AJ, Ceresa CDL, et al. A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature.* 2018;557(7703):50-6.
120. Liu Q, Hassan A, Pezzati D, Soliman B, Lomaglio L, Grady P, et al. Ex Situ Liver Machine Perfusion: The Impact of Fresh Frozen Plasma. *Liver Transpl.* 2020;26(2):215-26.
121. Cardini B, Oberhuber R, Fodor M, Hautz T, Margreiter C, Resch T, et al. Clinical Implementation of Prolonged Liver Preservation and Monitoring Through Normothermic Machine Perfusion in Liver Transplantation. *Transplantation.* 2020;104(9):1917-28.
122. Hoyer DP, Mathé Z, Gallinat A, Canbay AC, Treckmann JW, Rauen U, et al. Controlled Oxygenated Rewarming of Cold Stored Livers Prior to Transplantation: First Clinical Application of a New Concept. *Transplantation.* 2016;100(1):147-52.
123. Hoyer DP, Benkö T, Manka P, von Horn C, Treckmann JW, Paul A, et al. Long-term Outcomes After Controlled Oxygenated Rewarming of Human Livers Before Transplantation. *Transplant Direct.* 2020;6(4):e542.
124. van Leeuwen OB, de Vries Y, Fujiyoshi M, Nijsten MWN, Ubbink R, Pelgrim GJ, et al. Transplantation of High-risk Donor Livers After Ex Situ Resuscitation and Assessment Using Combined Hypo- and Normothermic Machine Perfusion: A Prospective Clinical Trial. *Ann Surg.* 2019;270(5):906-14.
125. Nykonenko A, Vavra P, Zonca P. Anatomic Peculiarities of Pig and Human Liver. *Exp Clin Transplant.* 2017;15(1):21-6.
126. Liebich HEKH-G. Anatomie der Haussäugetiere Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis 3ed. Stuttgart, Germany: Schattauer; 2005.
127. Court FG, Wemyss-Holden SA, Morrison CP, Teague BD, Laws PE, Kew J, et al. Segmental nature of the porcine liver and its potential as a model for experimental partial hepatectomy. *Br J Surg.* 2003;90(4):440-4.
128. Schenk JKEBAKM. Defined Automatic Normothermic Liver Perfusion during more than 53 Hours Including Integrated Dialysis and Simulated Physiological Diaphragmatic Movement. *European Surgical Research.* 2021:S. 21.
129. Kriegsmann J, Lang F, Schreiner J, Schoenleber S, Schad E, Wizemann C, et al., editors. Reduction of ischemic reperfusion injury during 24 hours in a porcine model through normothermic liver perfusion during hepatectomy. *TRANSPLANTATION; 2022: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA*
130. Bertolani FLJKJSSSESCWCRMSAKE. Harvesting, transport and maintenance of a normothermic perfused liver. *Innovative Surgical Science* 2022:S. 174.
131. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique: Methuen; 1959.
132. Schlegel A, de Rougemont O, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P. Protective mechanisms of end-ischemic cold machine perfusion in DCD liver grafts. *J Hepatol.* 2013;58(2):278-86.
133. Henry SD, Nachber E, Tulipan J, Stone J, Bae C, Reznik L, et al. Hypothermic machine preservation reduces molecular markers of ischemia/reperfusion injury in human liver transplantation. *Am J Transplant.* 2012;12(9):2477-86.

134. Xu H, Berendsen T, Kim K, Soto-Gutiérrez A, Bertheium F, Yarmush ML, et al. Excorporeal normothermic machine perfusion resuscitates pig DCD livers with extended warm ischemia. *J Surg Res*. 2012;173(2):e83-8.
135. Jassem W, Xystrakis E, Ghnewa YG, Yuksel M, Pop O, Martinez-Llordella M, et al. Normothermic Machine Perfusion (NMP) Inhibits Proinflammatory Responses in the Liver and Promotes Regeneration. *Hepatology*. 2019;70(2):682-95.
136. MacConmara M, Hanish SI, Hwang CS, De Gregorio L, Desai DM, Feizpour CA, et al. Making Every Liver Count: Increased Transplant Yield of Donor Livers Through Normothermic Machine Perfusion. *Ann Surg*. 2020;272(3):397-401.
137. Perera T, Mergental H, Stephenson B, Roll GR, Cilliers H, Liang R, et al. First human liver transplantation using a marginal allograft resuscitated by normothermic machine perfusion. 2016;22(1):120-4.
138. Mergental H, Perera MT, Laing RW, Muiesan P, Isaac JR, Smith A, et al. Transplantation of Declined Liver Allografts Following Normothermic Ex-Situ Evaluation. *Am J Transplant*. 2016;16(11):3235-45.
139. Ceresa CDL, Nasralla D, Jassem W. Normothermic Machine Preservation of the Liver: State of the Art. *Current transplantation reports*. 2018;5(1):104-10.
140. Eshmuminov D, Leoni F, Schneider MA, Becker D, Muller X, Onder C, et al. Perfusion settings and additives in liver normothermic machine perfusion with red blood cells as oxygen carrier. A systematic review of human and porcine perfusion protocols. 2018;31(9):956-69.
141. O'Neil MP, Fleming JC, Badhwar A, Guo LR. Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: microcirculatory and systemic effects. *Ann Thorac Surg*. 2012;94(6):2046-53.
142. Koning NJ, Vonk AB, van Barneveld LJ, Beishuizen A, Atasever B, van den Brom CE, et al. Pulsatile flow during cardiopulmonary bypass preserves postoperative microcirculatory perfusion irrespective of systemic hemodynamics. *J Appl Physiol (1985)*. 2012;112(10):1727-34.
143. Attaye I, Smulders YM, de Waard MC, Oudemans-van Straaten HM, Smit B, Van Wijhe MH, et al. The effects of hyperoxia on microvascular endothelial cell proliferation and production of vaso-active substances. *Intensive care medicine experimental*. 2017;5(1):22.
144. Neuhaus P, Blumhardt G. Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. *The International journal of artificial organs*. 1993;16(10):729-39.
145. Linares-Cervantes I, Kollmann D, Goto T, Echeverri J, Kathis JM, Hamar M, et al. Impact of Different Clinical Perfusates During Normothermic Ex Situ Liver Perfusion on Pig Liver Transplant Outcomes in a DCD Model. *Transplant Direct*. 2019;5(4):e437.
146. Matton APM, Burlage LC, van Rijn R, de Vries Y, Karangwa SA, Nijsten MW, et al. Normothermic machine perfusion of donor livers without the need for human blood products. *Liver Transpl*. 2018;24(4):528-38.
147. Nemeth N, Peto K, Magyar Z, Klarik Z, Varga G, Oltean M, et al. Hemorheological and microcirculatory factors in liver ischemia-reperfusion injury—An update on pathophysiology, molecular mechanisms and protective strategies. 2021;22(4):1864.
148. DiRito JR, Hosgood SA, Reschke M, Albert C, Bracaglia LG, Ferdinand JR, et al. Lysis of cold-storage-induced microvascular obstructions for ex vivo revitalization of marginal human kidneys. 2021;21(1):161-73.
149. Harris M, Raigani S, Albert C, Reschke M, Carroll C, Langford J, et al., editors. Rouleaux Formation in Human Livers During Normothermic Machine Perfusion. *AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION*; 2020: WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.
150. Tingle SJ, Thompson ER, Bates L, Ibrahim IK, Figueiredo R, Bury Y, et al. Microvascular obstructions in portal bile duct capillaries and hepatic sinusoids during normothermic machine perfusion of marginal human livers. 2020.

151. Haque O, Raigani S, Rosales I, Carroll C, Coe TM, Baptista S, et al. Thrombolytic Therapy During ex-vivo Normothermic Machine Perfusion of Human Livers Reduces Peribiliary Vascular Plexus Injury. *Frontiers in surgery*. 2021;8:644859.
152. Starzl T, Porter K, Kashiwagi N, Putnam CJS, gynecology, obstetrics. Portal hepatotrophic factors, diabetes mellitus and acute liver atrophy, hypertrophy and regeneration. 1975;141(6):843.
153. Schön MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation*. 1993;56(1):24-31.
154. Imber CJ, St Peter SD, de Cenarruzabeitia IL, Lemonde H, Rees M, Butler A, et al. Optimisation of bile production during normothermic preservation of porcine livers. *Am J Transplant*. 2002;2(7):593-9.
155. Echeverri J, Goldaracena N, Kathis JM, Linares I, Roizales R, Kollmann D, et al. Comparison of BQ123, Epoprostenol, and Verapamil as Vasodilators During Normothermic Ex Vivo Liver Machine Perfusion. *Transplantation*. 2018;102(4):601-8.
156. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
157. Clavien P-A, Yadav S, Sindram D, Bentley RCJAos. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. 2000;232(2):155.
158. Robertson FP, Fuller BJ, Davidson BR. An Evaluation of Ischaemic Preconditioning as a Method of Reducing Ischaemia Reperfusion Injury in Liver Surgery and Transplantation. *J Clin Med*. 2017;6(7).
159. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*. 2007;13(6):688-94.
160. Lang JD, Jr., Teng X, Chumley P, Crawford JH, Isbell TS, Chacko BK, et al. Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2583-91.
161. Yamanaka K, Houben P, Bruns H, Schultze D, Hatano E, Schemmer P. A systematic review of pharmacological treatment options used to reduce ischemia reperfusion injury in rat liver transplantation. *PLoS One*. 2014;10(4):e0122214.
162. Lee W-Y, Lee S. Protective effects of α -tocopherol and ischemic preconditioning on hepatic reperfusion injury. *Archives of Pharmacol Research*. 2005;28(12):1392-9.
163. Seo MY, Lee SM. Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *J Hepatol*. 2002;36(1):72-7.
164. Kaya Y, Coskun T, Aral E, Erkasap N, Var A. The effect of trimetazidine on liver regeneration after partial hepatectomy under hepatic blood inflow occlusion. *Hepato-gastroenterology*. 2003;50(51):651-5.
165. Weigand MA, Plachky J, Thies JC, Spies-Martin D, Otto G, Martin E, et al. N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation*. 2001;72(4):694-8.
166. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5935):1710-3.
167. Tabet J, García-Valdecasas JC, Rull R, Valero R, Angás J, González FX, et al. Non-heart-beating donor pigs: the feasibility of liver donation. *Transplant Proc*. 1997;29(1-2):1374-5.
168. van de Leemkolk FEM, Schurink IJ, Dekkers OM, Oniscu GC, Alwayn IPJ, Ploeg RJ, et al. Abdominal Normothermic Regional Perfusion in Donation After Circulatory Death: A Systematic Review and Critical Appraisal. *Transplantation*. 2020;104(9):1776-91.

169. Noormohamed MS, Kanwar A, Ray C, Wright MC, Cowie DE, Stamp S, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for resuscitation of deceased cardiac donor livers for hepatocyte isolation. *J Surg Res.* 2013;183(2):e39-48.
170. Net M, Valero R, Almenara R, Barros P, Capdevila L, López-Boado MA, et al. The effect of normothermic recirculation is mediated by ischemic preconditioning in NHBD liver transplantation. *Am J Transplant.* 2005;5(10):2385-92.
171. Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis MH, Muñoz J, Taurá P, Calatayud D, et al. Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion. *Ann Surg.* 2011;254(6):1000-7.
172. He X, Guo Z, Zhao Q, Ju W, Wang D, Wu L, et al. The first case of ischemia-free organ transplantation in humans: A proof of concept. *Am J Transplant.* 2018;18(3):737-44.
173. Guo Z, Zhao Q, Huang S, Huang C, Wang D, Yang L, et al. Ischaemia-free liver transplantation in humans: a first-in-human trial. *Lancet Reg Health West Pac.* 2021;16:100260.
174. Boteon YL, Attard J, Boteon A, Wallace L, Reynolds G, Hubscher S, et al. Manipulation of Lipid Metabolism During Normothermic Machine Perfusion: Effect of Defatting Therapies on Donor Liver Functional Recovery. *Liver Transpl.* 2019;25(7):1007-22.
175. Dengu F, Abbas SH, Ebeling G, Nasralla D. Normothermic Machine Perfusion (NMP) of the Liver as a Platform for Therapeutic Interventions during Ex-Vivo Liver Preservation: A Review. *J Clin Med.* 2020;9(4).
176. Laing RW, Stubblefield S, Wallace L, Roobrouck VD, Bhogal RH, Schlegel A, et al. The delivery of multipotent adult progenitor cells to extended criteria human donor livers using normothermic machine perfusion. *Frontiers in immunology.* 2020;11:1226.
177. Goldaracena N, Spetzler VN, Echeverri J, Kathis JM, Cherepanov V, Persson R, et al. Inducing Hepatitis C Virus Resistance After Pig Liver Transplantation-A Proof of Concept of Liver Graft Modification Using Warm Ex Vivo Perfusion. *Am J Transplant.* 2017;17(4):970-8.
178. Gillooly AR, Perry J, Martins PN. First report of siRNA uptake (for RNA interference) during ex vivo hypothermic and normothermic liver machine perfusion. *LWW;* 2019.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut der Experimentelle Chirurgie Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie (AVT) unter der Betreuung von Priv.- Doz. Dr. Martin Schenk durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Elisa Bertolani (Ärztin in Weiterbildung), Priv. Doz. Dr. Martin Schenk (Institutsleiter Experimentelle Chirurgie) und Julian Kriegsmann (Doktorand, Studiengang Humanmedizin).

Die Entwicklung, der Aufbau, die Versuchsdurchführung und Laboranalyse wurde eigenständig durchgeführt. Nach Einarbeitung durch Julian Kriegsmann wurde unter seiner Leitung bei der Durchführung von Langzeitversuchen (24 bis 72 Stunden) zur Probengewinnung und Versuchsüberwachung auf studentische Hilfskräfte zurückgegriffen: Fabian Lang, Corinna Rau, Sarah Schönleber, Estelle Schad und Chiara Wizemann. Der Doktorand war während der Ablösungen durch die studentischen Hilfskräfte durchgängig im Labor anwesend und erreichbar. Der operative Teil der Versuchsdurchführung erfolgte unter Aufsicht durch Priv.- Doz. Dr. Martin Schenk und Dr. Elisa Bertolani und wurde bei späteren Versuchen eigenständig vom Doktoranden durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch den Doktoranden.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die im Ergebnisteil der jeweiligen Versuche eingebrachten Literaturangaben verweisen auf die eigenen im Rahmen von Kongressen publizierten Veröffentlichungen.

Tübingen, den 17.02.2025

8. Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

1. 138. Deutscher Gesellschaft für Chirurgen Kongress Annual Congress 2021
(Referent)

Defined Automatic Normothermic Liver Perfusion during more than 53 Hours Including Integrated Dialysis and Simulated Physiological Diaphragmatic Movement.

Kriegsmann J, Bertolani E, Königsrainer A, Schenk M; Eur Surg Res 2021;62(suppl 1): S. 21

2. 139. Deutscher Gesellschaft für Chirurgen Kongress Annual Congress 2022

Harvesting, transport and maintenance of a normothermic perfused liver

Fabian Lang, Julian Kriegsmann, Jakob Schreiner, Sarah Schönleber, Estelle Schad, Chiara Wizemann, Corinna Rau, Martin Schenk, Alfred Königsrainer, Elisa Bertolani; Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübingen, Deutschland; Innov Surg Sci 2022; 7, (Special Suppl 1): S. 174

3. International Congress on Liver Transplantation 2022; Istanbul, Turkey
Posterpräsentation:

Reduction of ischemic reperfusion injury during 24 hours in a porcine model through normothermic liver perfusion during hepatectomy

Kriegsmann J, Lang F, Schreiner J, Schoenleber S, Schad E, Wizemann C, Rau C, Schenk M, Königsrainer A, Bertolani E; 2022

9. Danksagung

Sehr geehrte Damen und Herren, ich möchte diese Gelegenheit nutzen meine aufrichtige Dankbarkeit und Wertschätzung für all jene zum Ausdruck zu bringen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an meinen wundervollen Doktorvater Priv. Doz. Dr. Martin Schenk und meine über allen Maßen engagierte Betreuung durch Dr. med. univ. Elisa Bertolani, die mich zu jeder Zeit unterstützt und gefördert haben. Eure Expertise und konstruktive Rückmeldung haben entscheidend zu meinem wissenschaftlichen Werdegang beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter des ehemaligen Instituts der Experimentellen Chirurgie Universitätsklinik Tübingen und an die von mir angeleiteten studentischen Hilfskräfte, die mich während der experimentellen Phase unterstützt haben. Ohne euren Beitrag wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte auch meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden danken, die mir in dieser Zeit den notwendigen Rückhalt gegeben haben. Eure Unterstützung war für mich von unschätzbarem Wert.

Nicht zuletzt danke ich den Institutionen und Organisationen, die mir die für diese Arbeit notwendigen Ressourcen zur Verfügung gestellt haben, ohne die Durchführung der experimentellen Phase nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an alle, die zum Erfolg meiner Dissertation beigetragen haben.