

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG - EPPENDORF

Aus der Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Dr. Hermann Reichenspurner

Optimierung eines ex-vivo-Reperusionsmodells zur Erweiterung des Organspenderpools bei Lungentransplantationen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

York von Rittberg
aus München
Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.02.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Florian M. Wagner

Prüfungsausschuss, 2. Gutachterin: PD. Dr. Uta Herden

1	Einleitung	3
1.1	Einführung	3
1.2	Erweiterung des Organspenderpools	4
1.3	Geschichte der Lungentransplantation	6
1.4	Bisherige Arbeit der Forschungsgruppe	7
1.5	Zielsetzung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Versuchsaufbau und Rahmenbedingungen	10
2.1.1	<i>Versuchsgruppen</i>	10
2.1.2	<i>Ex-Vivo-Reperusionsmodell</i>	11
2.1.3	<i>Versuchstiere</i>	13
2.1.4	<i>Verwendete Lösungen</i>	14
2.1.5	<i>Versuchsprotokoll</i>	15
2.2	Prä-Explantations-Phase	16
2.2.1	<i>Prämedikation und Narkose</i>	16
2.2.2	<i>Chirurgische Präparation</i>	17
2.2.3	<i>In situ-Messung</i>	17
2.2.4	<i>Kanülierung und Blutentnahme</i>	18
2.3	Explantation-Phase und Herz-Lungenblock-Präparation	18
2.3.1	<i>Antegrade Lungenperfusion</i>	18
2.3.2	<i>Explantation und Lungenperfusion retrograd</i>	19
2.3.3	<i>Präparation Herz-Lungen-Block</i>	19
2.3.4	<i>Vorbereitung des Reperusions-Systems und Priming</i>	20
2.4	Reperusions-Phase	20
2.4.1	<i>Anschluss an das InVitro-Modell</i>	20
2.4.2	<i>Messdatenerhebung</i>	21
2.4.3	<i>Pulmonary Deflation Index (PDI)</i>	22
2.4.4	<i>Definitionskriterien "Transplantabilität"</i>	22
2.5	Gewebeprobenentnahme und deren Analyse	23
2.5.1	<i>Histologie</i>	23
2.5.2	<i>Wet-Dry-Ratio</i>	24
2.5.3	<i>MPO-Assay</i>	24
2.6	Vorversuche und außerplanmäßige Versuche	26
2.6.1	<i>Vorversuche 1-3</i>	26
2.6.2	<i>Steen-Versuche</i>	27
2.7	Statistische Methoden	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Allgemeine Beobachtungen	29
3.2	Ergebnisse offenes versus geschlossenes System	30
3.2.1	<i>Conclusio</i>	30
3.2.2	<i>Respiratorische Parameter</i>	30
3.2.2.1	<i>Oxygenierung</i>	30
3.2.2.2	<i>CO₂-Eliminierung in der Spenderlunge</i>	31
3.2.2.3	<i>Atemhubvolumen und Beatmungsdruck</i>	32
3.2.2.4	<i>Statische Compliance</i>	33
3.2.3	<i>Hämodynamische Parameter</i>	34
3.2.3.1	<i>PA- und LA-Druck</i>	34
3.2.3.2	<i>Pulmonaler Gefäßwiderstand</i>	35
3.2.4	<i>Intrapulmonaler Wassergehalt</i>	36
3.2.4.1	<i>PDI</i>	36
3.2.4.2	<i>Wet-dry-ratio</i>	37
3.2.5	<i>Analyse der Gewebeproben</i>	39
3.2.5.1	<i>Histologie</i>	39
3.2.5.2	<i>MPO</i>	39

3.3	Ergebnisse zellhaltiger versus zellfreier Perfusion	41
3.3.1	<i>Conclusio</i>	41
3.3.2	<i>Respiratorische Parameter</i>	41
3.3.2.1	Oxygenierung.....	41
3.3.2.2	CO ₂ -Eliminierung in der Spenderlunge.....	42
3.3.2.3	Atemhubvolumen und Beatmungsdruck.....	43
3.3.2.4	Statische Compliance.....	43
3.3.3	<i>Hämodynamische Parameter</i>	44
3.3.3.1	PA- und LA-Druck	44
3.3.3.2	Pulmonaler Gefäßwiderstand.....	45
3.3.4	<i>Intrapulmonaler Wassergehalt</i>	46
3.3.4.1	PDI	46
3.3.4.2	Wet-dry-ratio	47
3.3.5	<i>Analyse der Gewebeproben</i>	48
3.3.5.1	Histologie.....	48
3.3.5.2	MPO.....	49
3.4	Aspekte des Stoffwechsels	51
3.4.1	<i>Elektrolytverschiebungen</i>	51
3.4.2	<i>Laktatanstieg</i>	52
4	Diskussion	53
4.1	Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll.....	53
4.2	Vergleich der Reperfusionssysteme	57
4.3	Diskussion der zellfreien und zellreichen Organperfusion	60
4.4	Diskussion der Stoffwechselentgleisung.....	62
4.5	Limitation der Arbeit.....	64
4.6	Ausblick	64
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	68
7	Abkürzungsverzeichnis	78
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	80
9	Anhang	83
9.1	Danksagung	83
9.2	Lebenslauf	84
9.3	Eidesstattliche Erklärung.....	85

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Lungentransplantation gilt heute als eine akzeptierte und etablierte Methode bei der Therapie von Patienten mit terminalen Lungenerkrankungen (Wilkes et al. 2005). Obwohl die erste Lungentransplantation beim Menschen in den sechziger Jahren stattfand, dauerte es fast 20 Jahre bis nennenswerte klinische Erfolge mit der Einführung von Cyclosporin erzielt werden konnten (Fan et al. 2009). Diese Entwicklung beruht auf vielen Einzelerfolgen, wie eine Verbesserung in der Immunsuppressionstherapie, optimierten chirurgischen Techniken, einer besseren postoperativen Nachbetreuung und Fortschritten in der Organerhaltung nach der Entnahme (Lardinois et al. 2005).

Die Lungentransplantation stellt die ultima ratio Therapie bei vielen Lungenerkrankungen dar, die trotz optimaler konservativer Therapie in ihrem Verlauf nicht aufzuhalten sind. Zu den häufigsten Indikationen für eine Transplantation bei Erwachsenen gehören das Lungenemphysem basierend auf einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD, 36%) bzw. aufgrund von α 1-anti-Trypsin-Mangel (7%), die idiopathische Lungenfibrose (22%) sowie die cystische Fibrose (16%). Je nach Indikation kommen dabei Einzel- oder Doppellungen-transplantationen in Frage. In den letzten zehn Jahren konnte dabei eine Zunahme bei den Doppellungen-transplantationen beobachtet werden, während die Zahl der Einzellungen-transplantationen relativ konstant geblieben ist (Yusen et al. 2016).

Der limitierende Faktor bei Lungentransplantationen stellt jedoch die geringe Zahl der verfügbaren Organe dar (van Raemdonck 2010). Dies führt dazu, dass viele Patienten versterben bevor die lebensrettende Transplantation stattfinden kann (Neyrinck et al. 2006). Aus diesem Grund ist man in den letzten Jahren dazu übergegangen, verschiedene Strategien zur Erweiterung des Organspendepools zu entwickeln (de Perrot et al. 2004).

Obwohl signifikante Fortschritte in den vergangenen 25 Jahren in diesem Bereich gemacht wurden, bleiben die Kurz- und Langzeitergebnisse weit hinter den Transplantationen anderer „solider“ Organe zurück (Pierson 2006). Die Gesamt-Überlebensdauer lag bei den Lungentransplantationen zwischen Januar 1990 und Juni 2014 bei 5,8 Jahren im Median. Bei Patienten, die das erste Jahr überstanden haben, verbesserte sich die Spanne auf 8 Jahre. Gesamt-1Jahres-, 5Jahres- und 10Jahres-Überlebensraten werden mit ca. 80%, 54% und 32% angegeben (Yusen et al. 2016).

Zur Hauptursache für die frühe Mortalität nach einer Lungentransplantation – definiert als die ersten 30 Tage nach der Operation - gehören das akute Transplantatversagen (Primary graft dysfunction), non-CMV-Infektionen, kardiologische Komplikationen oder technische

Probleme. Für die Langzeitprognose, d.h. ein Jahr postoperativ und mehr, sind die chronische Abstoßungsreaktion in Form des Bronchiolitis-obliterans-Syndroms (BOS) sowie non-CMV-Infektionen verantwortlich (Christie et al. 2010). Vor allem das BOS bleibt die größte Komplikation nach Lungentransplantationen und wird mit einer Inzidenz von 51% nach 5,6 Jahren angegeben (Lama 2009).

1.2 Erweiterung des Organspenderpools

Wie in jedem Teilbereich der Transplantationsmedizin ist auch in der Lungentransplantationschirurgie die Knappheit der passenden Spenderorgane ein gravierendes Problem. Die Zahl der Lungentransplantationen weltweit stagniert seit einiger Zeit mit der Folge, dass die Zahl der Patienten auf der Warteliste kontinuierlich ansteigt (Ingemansson et al. 2009). Mindestens 13% versterben bevor ein geeignetes Organ verfügbar ist (Popov et al. 2015). Die Indikationen zur Transplantation wurden über die Jahre zusätzlich ausgeweitet (Kotloff und Thabut 2011).

Lediglich 15-17% der Lungen von Organspendern können transplantiert werden (Popov et al. 2015). Auf der einen Seite liegt der Grund hierfür in exogenen Schädigungen der Lunge durch Infektionen, Aspiration, Traumata oder in endogenen Schäden, bedingt durch Hirntod, neurogenem Lungenödem oder der Freisetzung von Cytokinen (Pierre et al. 2002). Andererseits führt die relative strikte Auslegung und Anwendung der Transplantabilitätskriterien, die vor ca. 30 Jahren aufgestellt wurden, zu dieser eher geringen Quote geeigneter Spenderorgane (Kotloff und Thabut 2011).

Wie bereits erwähnt ist daher in den letzten Jahren an vielen Strategien gearbeitet worden, um dieser Problematik entgegenzuwirken. Hierzu gehören Verbesserungen im Organerhaltungsmanagement nach Hirntod, bessere Methoden der Lungenkonservierung, die Benutzung von Organen von herztoten Spendern („non-heart-beating donors“), Lebendspenden oder eine Ausweitung der Auswahlkriterien zur Lungentransplantation durch die Einbeziehung von sogenannten „Marginalspendern“ (de Perrot et al. 2004). Gerade hier setzt das Konzept der ex-vivo Lungenperfusion (EVLP) an, um die Funktion einer Lunge von sogenannten „Marginalspendern“ zu evaluieren oder nach Möglichkeit sogar zu verbessern (Wallinder et al. 2016).

Die strikte Anwendung der Standard-Kriterien führt letztendlich dazu, dass nahezu die Hälfte der angebotenen Spenderorgane für eine Transplantation formell ungeeignet sind (Machuca 2014). Viele Zentren sind mittlerweile von der strikten Auslegung der

Transplantabilitätskriterien abgerückt und verwenden zunehmend Marginalspender (auch „extended donors“ genannt), jedoch stets nach individueller Abwägung (Botha 2009).

So wurde zum Beispiel ein Alter über 65 Jahre in den letzten Patienten-Leitlinien als eine relative Kontraindikation eingestuft und nicht mehr als absolute wie in den vorherigen Leitlinien von 1998 (Orens et al. 2006, Arcasoy et al. 2009). Letztendlich kommt Van Raemdonck in seinem Review-Artikel zum Schluss, dass das Outcome bei Verwendung dieser „extended“ Kriterien sehr ähnlich zu dem bei Standardbedingungen ist (van Raemdonck et al. 2009). Auch Schiavon berichtet nach seiner Auswertung von insgesamt zehn retrospektiven Studien von diesem Ergebnis in Hinblick auf das Überleben (Schiavon et al. 2011).

Als absolute Kontraindikationen gelten nach wie vor ABO-Inkompatibilität, größere Thoraxtraumata, eine positive Tumoranamnese, diffuse Infiltrate in der Röntgenaufnahme sowie persistierende Aspirationszeichen in der Bronchoskopie (de Perrot et al. 2003).

Die nachfolgende Tabelle (Tab.1) zeigt die Standard und die erweiterten Auswahlkriterien von Lungenspendern (van Raemdonck et al. 2009, Bhorade et al. 2000, Straznicka et al. 2002).

Kriterien	Standard	Erweiterte Kriterien
Alter	< 55 Jahre	> 55 Jahre
ABO-Kompatibilität	identisch	identisch
Raucheranamnese	< 20 pack-years	> 20 pack-years
Röntgenthoraxaufnahme	Unauffällig	Lokale Abnormitäten
Pa O ₂ (fiO ₂ =100%, PEEP=5cmH ₂ O)	> 300 mmHg	< 300 mmHg
Aspiration / Sepsis	Negativ	
Thoraxtrauma	Negativ	Lokal begrenzt
Bronchoskopie	Unauffällig	Sekret in den großen Atemwegen
Sputumausstrich	Negativ	Positiv
Mechanische Ventilation	< 48h	> 48h
Anamnese	Keine kardiopulmonalen Operationen	

Tabelle 1: Auswahlkriterien von Lungenspendern

In Kanada, Schweden und den Niederlanden erlaubt es die Gesetzeslage auch Lungen von „herztoten“ Spendern („non-heart-beating donors“) zu transplantieren. Verschiedene Gruppen haben mittlerweile Daten geliefert, die die 1991 von Egan et al. formulierte Hypothese unterstützen, dass dieses Verfahren die Organknappheit mildern kann (Rega et al. 2003). Stig Steen war in diesem Bereich einer der Ersten, der ein ex-vivo Reconditionierungsmodell zur Evaluierung der Lungenfunktion solcher Spenderlungen etablierte (Steen et al.

2001,2003,2007). Dieses Konzept basiert auf der Annahme, dass Lungengewebe auch nach einem Herzstillstand für eine gewisse Zeit lebensfähig bleibt (Rega et al. 2003). Im Jahr 2005 erfolgte sogar die erste erfolgreiche Einzellungen-Transplantation beim Menschen nach Rekonditionierung einer primär abgelehnten Spenderlunge (Steen et al. 2007). Auch andere Forschungsgruppen haben basierend auf diesen Ergebnissen ähnliche ex-vivo Lungenperfusionsmodelle (EVLP) entwickelt, um die Funktionstüchtigkeit nicht akzeptierter Spenderlungen zu eruieren (Rega et al. 2004, Egan et al. 2006, Erasmus et. al 2006, Wierup et al. 2006). Zunächst erfolgte dies anhand tierexperimenteller Modelle oder an abgelehnten humanen Spenderlungen. Gemeinsames Ergebnis dieser Studien war, dass die EVLP als eine geeignete Methode zur Evaluierung der Lungenfunktion angesehen wurde. Mittlerweile hat sich in den letzten Jahren die EVLP auch im klinischen Bereich zunehmend etabliert. Klinische Studien (INSPIRE, NOVEL, DEVELOP, EXPAND) laufen bereits beziehungsweise zeigen erste positive Ergebnisse (van Raemdonck et al. 2015). Es gibt mehrere Gründe die EVLP bei grenzwertigen Spenderlungen zur Rekonditionierung und Prüfung anzuwenden. Hierzu gehören - wie in Tabelle 1 aufgeführt - Werte des $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300\text{mmHg}$, Anzeichen für ein Lungenödem im Röntgen oder auch mäßige Lungen-Compliance bei der klinischen Kontrolle. Aber auch mögliche Aspirationsschäden oder vermehrte Bluttransfusionen (>10) stellen eine Indikation dar. Ferner können Organe von „non-heart-beating donors“ so auf ihre Funktion geprüft werden (Machuca 2014).

Nach dem deutschen Transplantationsgesetz von 1997 ist die Organentnahme nur bei Patienten zulässig, bei denen eine Einwilligung zur Entnahme vorliegt und bei denen der Hirntod festgestellt wurde. Der Einsatz von Organen von an Herzstillstand verstorbenen Patienten („non-heart-beating donors“) ist demnach aus gesetzlichen und ethischen Gründen nicht möglich. Daher stellt die ex-vivo Lungenperfusion von primär abgelehnten Spenderlungen neben der Anwendung von Organen mit „extended donor“ Kriterien bei den momentanen Rahmenbedingungen in Deutschland einen sinnvollen Ansatz dar, die Zahl der geeigneten Spenderorgane zu erhöhen.

1.3 Geschichte der Lungentransplantation

Die ersten Herz-Lungentransplantationsversuche gehen auf den russischen Physiologen V.P.Demikhov im Jahr 1946 zurück und erfolgten an Hunden (Konstantinov 1998). Es dauerte aber noch bis 1963 bis Dr. J.Hardy die erste Transplantation einer Einzelle an einem Menschen durchführte (Hardy et al. 1963, Hardy 1999). Auch wenn der Patient knapp

drei Wochen später an einer Nierenkomplikation verstarb, war damit der Grundstein für die Lungentransplantationschirurgie gelegt. In den darauffolgenden Jahren folgten weltweit etwa vierzig weitere Lungentransplantationen, jedoch ohne nennenswerte Langzeitergebnisse (Grover et al. 1997). Neben operationstechnischen Schwierigkeiten wie Dehiszenzen der Anastomosen lagen die Hauptprobleme bei Infektionen und Abstossungsreaktionen.

Ab den frühen 80iger Jahren konnten mit der Einführung von wirksamen Immunsuppressiva (Cyclosporin) die ersten langfristigen Erfolge verbucht werden. Dr. J.Cooper und Kollegen berichteten im Jahr 1983 von einer Einzellungentransplantation mit zu damaliger Zeit erstaunlichem Langzeitergebnis (Cooper 1987, Cooper et al. 1987). Dieselbe Forschungsgruppe um Cooper erzielte in den kommenden Jahren fünf weitere beachtenswerte Erfolge (Toronto Lung Transplantat Group, 1986). Auch die erste Doppellungentransplantation wurde in Toronto durchgeführt (Patterson et al. 1988). Im Verlauf folgten an verschiedenen anderen Standorten weitere Lungentransplantationen und die Zahl dieser Operationen hat pro Jahr stetig zugenommen.

Nach zuletzt veröffentlichten Zahlen wurden bis Juni 2015 weltweit mehr als 55.000 Einzel- und Doppellungen transplantiert. Davon sind allein im Jahr 2014 insgesamt 3973 Lungentransplantationen weltweit durchgeführt worden (Yusen et al. 2016).

Im Vergleich dazu sind im Jahr 2015 in Deutschland 27 Einzel- und 262 Doppellungen transplantiert worden (Eurotransplant International Foundation), während die Zahl der auf der Warteliste befindlichen Patienten 396 betrug. Diese Zahlen verdeutlichen aber auch, dass diese Operationen nach wie vor nicht alltäglich sind, und sie zeigen die Diskrepanz zwischen verfügbaren und eigentlich benötigten Spenderorganen.

1.4 Bisherige Arbeit der Forschungsgruppe

Eine Forschungsgruppe unter der Leitung von PD Dr. Florian M. Wagner beschäftigt sich seit einigen Jahren mit der Thematik der Erweiterung des Organspenderpools durch Rekonditionierung von vor-geschädigten Spenderlungen. Entsprechend der ethischen und gesetzlichen Rahmenbedingungen in Deutschland bietet sich dieses Forschungsfeld an.

Die Grundidee liegt darin, durch Rekonditionierung von primär zur Transplantation abgelehnten Lungen die Anzahl der für eine Transplantation geeigneten Organe zu erhöhen. Hierzu konnte in dieser Arbeitsgruppe bereits ein vielversprechendes ex-vivo Reperfusionmodell etabliert werden (Wipper et al. 2007, 2008).

Neben der Entwicklung und Etablierung eines geeigneten Versuchsaufbaus und des ex-vivo-Reperfusion-Modells erfolgten bereits Versuche, bei der die Auswirkungen von Hirntod

bzw. von Aspirationsschäden auf die Lungen erforscht wurden. Auch der Einfluss intensivmedizinischer Maßnahmen sowie Applikation von Antithymozytenglobulin (ATG) und dessen Auswirkung auf die Leukozytenmigration wurde diesbezüglich untersucht.

Bisher konnten dabei gute Ergebnisse in einer sechsständigen Perfusionszeit mittels EVLP erzielt werden. Dennoch stellen sowohl eine persistierende Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands während der Perfusion als auch histologische Veränderungen ein bestehendes und nicht vollends beherrschbares Problem dar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, das Reperfusionssystem weiter zu optimieren. Gerade bezüglich des pulmonalvaskulären Widerstands (PVR) besteht die Arbeitshypothese, dass durch ein optimiertes System eine Reduzierung des PVR erzielt werden kann.

Erreicht werden soll dies durch eine Verbesserung in der Zusammensetzung der mechanischen Systemkomponenten. Geplant sind der Umstieg von einem offenem auf ein geschlossenes System und der Wechsel von einer Rollerpumpe zu einer Zentrifugpumpe. Ein geschlossener Heparin-beschichteter Kreislauf soll von Vorteil sein, da der Kontakt des Blutes mit fremden Material und Luft minimiert wird (Tanaka et al. 2003). Aber auch andere zuletzt veröffentlichte randomisierte klinische Studien zeigen ein besseres Outcome bei Verwendung eines geschlossenen Kreislaufes in Kombination mit einer Zentrifugpumpe auf (Murphy et al. 2009).

In einer Gruppe bestehend aus sechs Versuchstieren sollen deshalb die Auswirkungen der neuen Systemzusammensetzung im Vergleich zur Alten untersucht werden. Als Kontrollgruppe dient hierzu eine bestehende Gruppe (n=7) aus den bereits durchgeführten Studien dieser Arbeitsgemeinschaft.

Ein weiterer Aspekt in dieser Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkungen auf die Lunge, wenn die Zusammensetzung der Perfusionslösung, mit der das ex-vivo Reperfusionssystem befüllt ist, verändert wird. Bisher wurden die Lungen im Systemkreislauf mit einem Gemisch aus kristalloider Lösung (Steen-Lösung) und zellulären Bestandteilen (Erythrozytenkonzentrat) perfundiert. Basierend auf der Annahme, dass die zellulären Bestandteile in dieser Perfusionslösung einen negativen Effekt auf die Rekonditionierung der Lunge haben (Lee et al. 2007, Watanabe et al. 2007, Cypel et al. 2008), sollen in einer weiteren Gruppe die Auswirkungen einer Perfusion mit ausschließlich kristalloider Lösung (Steen-Lösung) untersucht werden.

Die Ergebnisse werden anschließend in Hinblick auf respiratorische und hämodynamische Veränderungen wie Gasaustausch, Compliance, Gefäßwiderstand und weiteren Parametern analysiert. Auch zelluläre Veränderungen sollen mittels Histologie und molekularbiologischer Verfahren untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und Rahmenbedingungen

Das gesamte Projekt wurde geprüft und genehmigt durch die zuständige Ethikkommission Hamburg und stand im Einklang mit der „Position of the American Heart Association on Research Animal Use“ (Circulation, April 1985). Durchgeführt wurden die Versuche im Tierversuchslabor auf dem Gelände des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durch die genannte Arbeitsgruppe der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie.

2.1.1 Versuchsgruppen

Das erste Ziel dieser Promotionsarbeit bestand in der Optimierung des bisherigen Reperfusionssystems. Hierzu wurde als Kontrollgruppe eine Versuchsgruppe mit 7 Tieren etabliert. Diese Kontrollgruppe wird nachfolgend als Gruppe 1 bezeichnet. Als Vergleich wurde eine Gruppe 2 (n=6) untersucht, die sich in verschiedenen mechanischen Systemkomponenten von der Kontrollgruppe unterscheidet. Genauer gesagt beinhaltet das einerseits den Umstieg von einem offenen auf ein geschlossenes System, weitere Ausführungen hierzu nachfolgend. Zum anderen wurde die Rollerpumpe durch eine Zentrifugalpumpe ersetzt. Das übrige Set-up blieb identisch zur Kontrollgruppe.

Gruppe	System	Perfusionsdauer	Perfusionslösung	Anmerkung
Gruppe 1	Rollerpumpe, offen	6h	zellhaltig	7 Versuchstiere
Gruppe 2	Zentrifugalpumpe, geschlossen	6h	zellhaltig	6 Versuchstiere
Gruppe 3	Zentrifugalpumpe, geschlossen	6h	zellfrei	8 Versuchstiere

Tabelle 2: Versuchsgruppen

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer zellhaltigen Perfusionslösung (Blut+Steen-Lösung) gegenüber einer zellfreien Perfusion (nur Steen-Lösung) der Versuchslungen. Hierzu wurde Gruppe 3 (n=8) etabliert, die hinsichtlich der Systemkomponenten identisch mit Gruppe 2 ist, sich jedoch in der Zusammensetzung der Perfusionslösung unterscheidet.

2.1.2 Ex-Vivo-Reperfusionssystem

Bisheriges Reperfusionssystem:

Die Versuchslunge wurde während der Reperfusionzeit in einem Plexiglastasten gelagert. Mit Hilfe einer Rollerpumpe (Multiflow Rollerpumpe, Stöckert Instrumente GmbH, München) wurde das Blut-Stein-Gemisch aus einem Reservoir durch das Kreislaufsystem gepumpt. Über einen Oxygenator (Lilliput, Sorin group Deutschland) erfolgte durch Zuführung eines Gasgemisches (6% Sauerstoff, 8% Kohlendioxid und 86% Stickstoff) zur Simulation des Körperstoffwechsels die Deoxygenierung des Blutes, so dass normale venöse Blutgaswerte erreicht werden konnten. Mittels Leukozytenfilter (Pall Leukogard LG, Terumo, Deutschland) wurde das Perfusat gefiltert und gelangte über eine in die Pulmonalarterie vorgeschobene Kanüle in das Organ. Nach der Lungenpassage erfolgte der Abfluss über eine weitere Kanüle aus dem linken Vorhof wieder zurück ins Reservoir. Sämtliche Schläuche bestanden aus heparinbeschichtetem Material. Zur Regulierung der Perfusats-temperatur war ein Wärmetauscher (Norm-o-temp, CincinnatiSub-zero, USA) integriert.

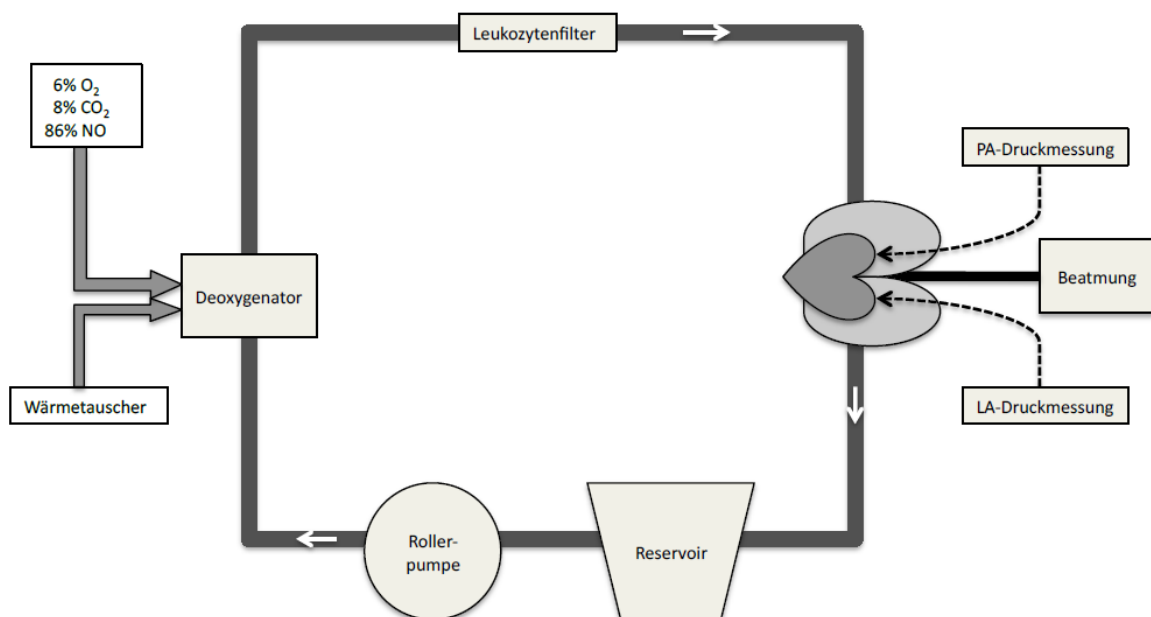


Abbildung 1: Schemazeichnung offenes Reperfusionssystem



Abbildung 2: offenes Reperfusionssystem



Abbildung 3: Plexiglaskasten

Neues Reperfuisionsmodell:

Wie oben erwähnt sind die wesentlichen Änderungen des neuen Modells der Umstieg von einem offenen System mit Reservoir zu einem geschlossenen System (Dideco, Modell ECC.O, Sorin group, Italien). Dies bedeutet, dass keine Luft mehr im Perfusionssystem vorhanden ist und somit der Blut/Luft-Kontakt im Vergleich zum offenen System mit Reservoir drastisch reduziert wird. Dies ist der Hauptunterschied zum offenen System, in dem im Reservoirbehälter das Perfusionsgemisch auch Luftkontakt hat (siehe Abbildung 2). Für eventuelle Volumenschwankungen wurde ein Reservoirbeutel zwischengeschaltet, über den bei Bedarf selektiv Volumen zu- bzw. abgegeben werden konnte. Auch hier wurde auf die Vermeidung des Blut/Luft-Kontaktes geachtet. Ebenso wurde das System von einer Rollerpumpe auf eine Zentrifugalpumpe (Motor: Bio-Console 550, Medtronic, USA sowie Pumpenkopf: Bio Pump BP-80, Medtronic, USA) umgestellt. Deoxygenator, Leukozytenfilter, Wärmetauscher sowie heparinbeschichtete Schläuche komplettierten auch im neuen System den Kreislauf.

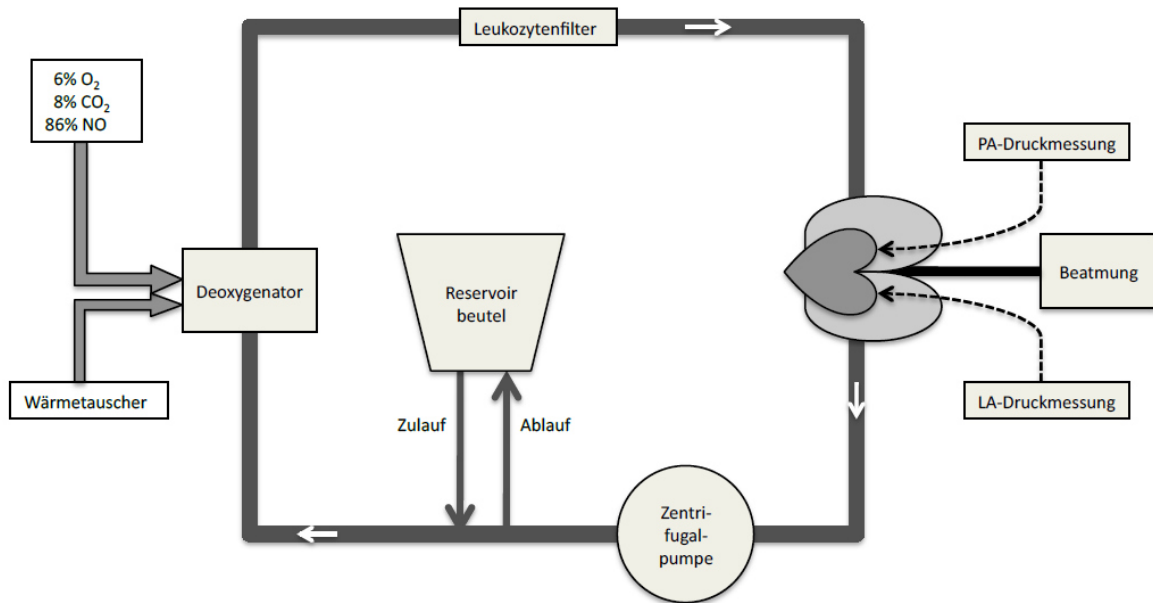


Abbildung 4: Schemazeichnung geschlossenes Reperfusionssystem

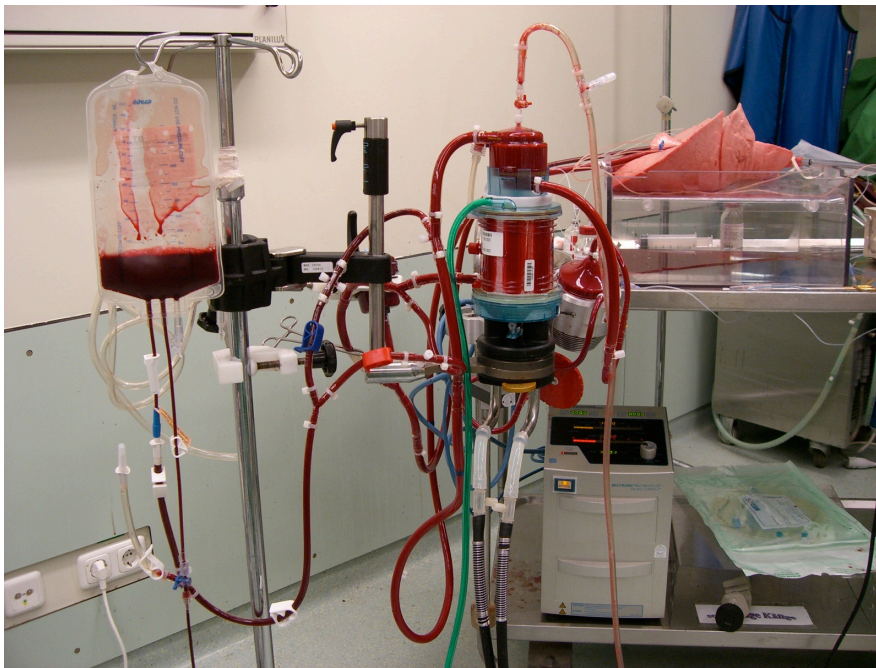


Abbildung 5: Geschlossenes Reperfusionssystem

2.1.3 Versuchstiere

Für die Lungenperfusionstudie wurden deutsche Hausschweine verwendet. Die Schweine hatten ein durchschnittliches Gewicht von 77,97 kg (=Mittelwert bei einer Standard-

abweichung von 15,26 kg). In dieser Gewichtsklasse entspricht die Schweinelunge hinsichtlich ihrer Größe am ehesten der eines ausgewachsenen Menschen.

Die Schweine aus der Tierzucht Lüneburg wurden nach Möglichkeit mindestens 4 Tage vor dem geplanten Versuch in die Tierzuchthaltung des Universitätsklinikum Eppendorf gebracht und mindestens 12h vor dem Versuch aus Schutz vor Aspirationskomplikationen nüchtern belassen. Es hat sich gezeigt, dass der Stress für die Tiere am Versuchstag durch die Eingewöhnungszeit erheblich reduziert werden konnte. Die artgerechte Haltung und der Versuchsablauf bis hin zur Tötung der Tiere stand stets im Einklang mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes von 1972 und unterlag der ständigen Überwachung der zuständigen Ethikkommission.

2.1.4 Verwendete Lösungen

Perfadex-Lösung:

Perfadex (Vitrolife, Göteborg, Schweden) ist eine speziell für die Lungentransplantation-chirurgie entwickelte Perfusionsflüssigkeit (de Perrot 2004). Sie zeichnet sich durch eine hohe kolloidosmotische Wirkungsweise sowie einem niedrigen extrazellulären Kaliumgehalt aus und dient der Konservierung der Lunge. Kurz vor bzw. nach der Explantation wird sie durch das pulmonal-arterielle Gefäßsystem des Organs gespült, um einerseits Blut auszuwaschen und andererseits die Lunge herunterzukühlen.

Zusammensetzung Perfadex:

1000ml Perfadex enthalten: 5% Dextran (Mw 40.000), 6mmol K⁺, 0,8 mmol Mg²⁺, 0,8 mmol H₂PO₄⁻ und H₂PO₄²⁻ und 5mmol Glucose bei einem pH-Wert von 5,5.

Kurz vor der Perfusion wurden die Perfadex-Beutel mit 0,6 ml Trometamol (Tris 36,34%, B.Braun Melsungen AG) sowie 1,2ml Glyceroltrinitrat (Nitrolingual infus) versehen. Trometamol bewirkt eine pH-Wertanhebung während das Glyceroltrinitrat über eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur eine homogene Perfusion ermöglichen soll.

Steen-Lösung:

Die Steen-Solution (Vitrolife, Göteborg, Schweden) wurde im System als Reperfusion-lösung verwendet. Stig Steen und Kollegen hat sie bereits 2003 erfolgreich zur ex-vivo-Perfusion eingesetzt und seitdem wird sie von mehreren Zentren weltweit verwendet (Steen et al. 2001, 2003, 2007).

Die Lösung enthält Glukose, Aminosäuren sowie eine dem Extrazellulärraum ähnliche Elektrolyt-Konzentration, um den Zellmetabolismus aufrecht zu erhalten. Weiterhin besteht sie aus Humanalbumin sowie Dextranen und verfügt somit über einen hohen onkotischen Druck, der eine Perfusion der Lunge ohne Ausbildung eines Ödems bzw. sogar eine Rückbildung eines bereits vorhandenen gewährleistet.

Erythrozytenkonzentrat:

In der Gruppe 1 und 2 wurde die „Steen-Solution“ im Reperfusionssystem in einem Mischungsverhältnis von 2:1 mit Erythrozytenkonzentrat des jeweiligen Versuchstieres gemischt. Richtwert war eine Hb-Werteinstellung der finalen Perfusionslösung zwischen 3-5g/dl bzw. Hct von 10-15%. In Gruppe 3 wurde während der gesamten Versuchsdauer der Herz-lungen-Block nur mit der Steen-Solution perfundiert.

Gewonnen wurde das Erythrozytenkonzentrat mittels eines Cellsavers (Dideco Compact advanced Cell Saver, Sorin group, Italien). Hierzu erfolgte die Hämodilution des Spendertieres kurz vor Explantation des Organs durch Punktion der mit Tabaksbeutelnaht präparierten Aorta bei gleichzeitiger rascher Gabe von Ringerlösung (B.Braun, Deutschland) sowie HAES-Lösung (HAES-Steril 6%, Fresenius KaBI, Deutschland) zur Stabilisierung der Hämodynamik über mehrere großlumige Venenverweilkanülen (Vasofix Safety 18G, B.Braun, Deutschland). Unter fortwährender Blutdruckkontrolle wurden 1500-2000ml Blut in zwei Transfusionsbeutel (Dideco BT277 Bag 1000ml) abgenommen und anschließend dem Cellsaver zugeführt wurden. Zusätzlich wurde Blut aus der Vena cava inferior während und nach der Organentnahme direkt in den Cellsaver abgesaugt. Insgesamt konnten so circa 500-750ml Erythrozytenkonzentrat gewonnen werden.

2.1.5 Versuchsprotokoll

Der gesamte Versuchsablauf kann in drei Phasen eingeteilt werden: Präexplantations-, Explantations- sowie Reperusionsphase.

Nach Prämedikation und Narkotisierung des Versuchstieres wurde tracheotomiert und Vorkehrungen zur Kreislaufüberwachung und -stabilisierung getroffen. Es folgte die Gabe von Methylprednisolon 500mg (Urbason solubile forte, Sanofi-Aventis, Deutschland) sowie Baselinemessungen. Nach einer Biopsieentnahme im rechten oder linken Mittellappen der Lunge wurde dem Versuchstier Heparin (Heparin-Natrium Braun, B.Braun, Deutschland) in der Dosierung 300 IE/kg Körpergewicht injiziert. Anschließend erfolgten die Blutentnahme und Hämodilution sowie die Lungenperfusion und die Explantation des Organs. Die Lunge

wurde weiter ex situ präpariert und an das InVitro-Modell angeschlossen. Die Temperatur und Flussgeschwindigkeit wurden schrittweise erhöht. Bei 32°C begann die Ventilation des Organs (siehe 2.4.1). Zu Beginn der Reperfusion sowie nach 3 Stunden wurden jeweils 500mg Methylprednisolon ins Reperfusionssystem gegeben. Nach einem festen Schema erfolgten fortlaufend Blutentnahmen sowie die Erfassung der respiratorischen und hämodynamischen Parameter. Am Ende der Reperfusionszeit (6h) wurden aus den sechs Lungenlappen Proben für verschiedene Gewebsuntersuchungen entnommen.

Im Folgenden werden die einzelnen Phasen genauer erklärt.

2.2 Prä-Explantations-Phase

Diese Phase umfasst den Zeitraum von Beginn des Versuchs bis zur Lungenexplantation.

2.2.1 Prämedikation und Narkose

Am Versuchstag wurde das nüchterne Schwein noch im Keller der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf prämediziert. Hierzu wurden Azaperon (4mg/kg KG), Midazolam (0,3mg/kg KG), Ketaminhydrochlorid (5mg/kg KG) und Atropinsulfat (0,15mg/kg KG) i.m. verabreicht.

Nach einigen Minuten und Einsetzen der sedierenden Wirkung von Midazolam wurde über eine Ohrvene ein Zugang (Vasofix Safety 20G, B.Braun, Deutschland) gelegt, durch den 8mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren) zur Vertiefung der Narkose gegeben wurden.

Anschließend wurde das Schwein mittels Trage und Rollwagen in den Großtier-OP transportiert. Nach Tracheotomie und endotrachealer Intubation (Mallinckrodt ID 8.0) wurde das jeweilige Versuchstier druckkontrolliert bei einem mittleren Beatmungsdruck von 15 cmH₂O, einer Sauerstoffsättigung von 50%, PEEP von 7 cmH₂O, einer Atemfrequenz von 16/min beatmet (Puritan Bennett 7200 series ventilory system) und in Rückenlage auf einer Heizdecke fixiert. Herz- und Atemfrequenz wurden über EKG-Elektroden kontinuierlich auf einem Monitor (Transcope 12 marquette electronics inc., Indiana, USA) überwacht. In halbstündigen Intervallen wurden arterielle Blutgasanalysen zur Kontrolle einer ausreichenden Oxygenierung durchgeführt.

Bis zum Zeitpunkt der Explantation des Herz-Lungenblocks wurde die Narkose mit Fentanyl (0,01mg/kg KG/h) sowie Midazolam (0,1mg/kg KG/h) über einen Perfusors (Perfusor fm, B.Braun, Deutschland) aufrechterhalten.

Je nach Kreislaufsituation und Narkosetiefe wurde bei Bedarf unterstützend 1-2ml Pentobarbital (Narcoren) intravenös nachgegeben.

Die Flüssigkeitssubstitution erfolgte mit NaCl-, Ringer-Lösung sowie HES 6%.

2.2.2 Chirurgische Präparation

Nach Sicherstellung der Narkose wurden Gefäßschleusen gelegt. Hierzu wurden zunächst die rechte Arteria carotis communis und die Vena jugularis interna freipräpariert. In die Arterie wurde eine Schleuse der Größe 6F, in die Vene eine Schleuse der Größe 8F eingeführt. Über letztere wurde ein SwanGanz-Katheter zur Messung des HZV, der PA-, der LA-Drücke und des ZVD eingeschwenkt. Ebenso wurden über diese Zugänge venöse und arterielle Blutgasanalysen abgenommen sowie Druckmessleitungen angeschlossen (DPS-Dreifach-Druckmess-System, Medex Medical, Lancashire, Großbritannien). In die linke Arteria femoralis wurde ebenfalls eine 5F-Schleuse gelegt und an ein PICCO-System angeschlossen (PICCO plus, Pulsion Medical Systems, München, Deutschland), über welches weitere hämodynamische Parameter kontrolliert wurden (MAP, SVR, CO).

Anschließend wurde nach erneuter Pentobarbitalgabe der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet. Die Lunge war dabei vom Beatmungssystem diskonnektiert, um die Gefahr der Schädigung bei der Thoraxöffnung zu minimieren. Es folgten die Abpräparation des Thymus und die Eröffnung des Perikards.

Eine ca. 5x5mm messende Lungengewebsprobe wurde vom LML als „Prae-Probe“ gewonnen und mit Stickstoff tiefgefroren. Der entstandene Gewebdefekt wurde mit 5-0 Prolene übernäht. Anschließend folgte die Vollheparinisierung des Versuchstiers mit 300 I.E./kg KG Heparin.

2.2.3 In situ-Messung

Beim narkotisierten Schwein wurden laufend Parameter zur Kreislaufüberwachung aufgenommen. Der erste Messzeitpunkt (Baseline) war unmittelbar nach der Sternotomie. Weitere folgten nach 30 und 60 Minuten. Zu diesen Zeitpunkten wurden Blutgaskontrollen (arteriell, venös, gemischt-venös) durchgeführt sowie Serum und EDTA-Röhrchen (für Leukozytenbestimmung) abgenommen. Die Tabelle 3 zeigt das hierzu verwendete Protokollblatt.

PiCCO	HF	HZV	MAD	RR _{sys}	RR _{dia}	ZVD	SVR	Uhrzeit
Baseline								
30								
60								
Atmung	AF	PEEP	fiO ₂	AHV	P _{max}	P _{min}	P _{plateau}	Uhrzeit
Baseline								
30								
60								
SG	HF	SVR	MAD	P _{Am}	L _{Am}	ZVD	PVR	Uhrzeit
Baseline								
30								
60								

Tabelle 3: In situ-Parameter

2.2.4 Kanülierung und Blutentnahme

Während der 60 Minuten andauernden Baselinemessungs-Phase wurden zwischenzeitlich Explantationsvorbereitungen getroffen. So wurden die Vena cava superior sowie inferior mit einer Ligatur (2-0 Vicryl, Ethicon) umschlungen. Am Herz wurde die Arteria pulmonalis von der Aorta ascendens separiert. Auf der Aorta wurde eine Tabaksbeutelnaht (3-0 Prolene, Ethicon) für die spätere Blutentnahme gesetzt und mit einem Tourniquet fixiert. Die Pulmonalarterie wurde ebenfalls mit Tabaksbeutel und Tourniquet versehen. Anschließend wurde eine arterielle Kanüle (16F, Medtronic DLP, Minneapolis, USA) in die Arteria pulmonalis eingeführt, fixiert und mit einer Maschinenklemme verschlossen bzw. kurz darauf luftfrei an das Perfusionssystem angeschlossen.

Nach den 60min-Baselinewerten folgte die Hämodilution. Hierzu wurden zur Volumensubstitution 2x500ml Ringer sowie eine 500ml HAES 6% zügig infundiert und parallel aus der Aorta ca. 1500-2000ml Blut in 2 Transfusionsblutbeutel (500ml Compoflex CPDA-1-Stabilisator 70ml, Fresenius Hemocare) abgenommen, von dort in einen Cellsaver (cell saver compact advanced, Dideco) abgesaugt und aufbereitet.

2.3 Explantation-Phase und Herz-Lungenblock-Präparation

2.3.1 Antegrade Lungenperfusion

Nach dem 60min-Messwert wurden die Ligaturen um die Vena cava superior und inferior zugeknotet, der Sinus coronarius mit einer Satinsky-Klemme und die Aorta mit einer gebogenen Aortenklemme abgeklemmt. Die Pulmonalarterie wurde hinter der bereits liegenden 16F-Kanüle mittels Klemme verschlossen. Das Herz wurde mit dem Elektrocauter zum Flimmern gebracht. Nach einer 1cm-Incision im linken Vorhofohr konnte die Perfusion

über die 16F-Kanüle gestartet werden. Die 4°C kühle Perfadex-Lösung wurde in einer Höhe von ca. 50cm über dem Herz angehängt, um möglichst physiologische Druckverhältnisse in der Pulmonalarterie zu erzielen. In der Regel wurden ca. 1000-1500ml Perfadex-Lösung durch die Lunge gespült – solange bis aus der Vorhofohrincision klare Flüssigkeit austrat (durchschnittliche Perfusionszeit von 4 min). Zeitgleich wurde in die zuvor eröffneten Pleurahöhlen 4°C kalte Natriumchloridlösung sowie crushed ice zur Organkühlung und Minderung der Herzaktivität gegeben.

Während der Perfusion wurde die Atemfrequenz auf 8/min bei einem $FiO_2=50\%$ reduziert. Der Beatmungsdruck betrug 8cmH₂O und der PEEP weiterhin 7 cmH₂O.

2.3.2 Explantation und Lungenperfusion retrograd

Nach der antegraden Perfusion wurde das Perikard vollständig abpräpariert, die Vena cava inferior ein zweites mal ligiert und zwischen beiden Ligaturen durchgetrennt. Die Ligamenta pulmonales wurden gekappt, die Pleura wurde beidseits des Ösophagus abpräpariert. Die Schleusen wurden entfernt, die supraaortalen Äste des Aortenbogens gekappt. Die Aorta wurde hinter dem Aortenbogen, die Trachea oberhalb der Tubuseintrittsstelle durchtrennt. Es wurde weiter stumpf präpariert, bis der Herz-Lungenblock aus dem Thorax zu entnehmen war.

Anschließend wurde das Organ zur Vermeidung bzw. zum Öffnen bereits vorhandener Atelektasen vorsichtig mit einem PEEP von 7-10mmHg, einem I:E-Verhältnis von 1:1 und einem Inspirationsdruck von 15mmHg kontrolliert gebläht. Nach 2-3min Beatmung wurde die Lunge im halb geblähten Zustand am Tubus mit einer Maschinenklemme abgeklemmt und zur topischen Kühlung in eine mit kalter Natriumchloridlösung gefüllten Schüssel gegeben. Anschließend wurde die arterielle Kanüle aus der Arteria pulmonalis entfernt und durch die Incisionsstelle in den linken Vorhof geführt. Es wurden erneut etwa 1000-1500ml Perfadex – diesmal retrograd – durch die Lunge gespült bis wieder klare Flüssigkeit aus der Arteria pulmonalis floss (durchschnittliche Perfusionszeit=3,5min). Die retrograde Perfusion führt zu einer homogenen intrapulmonalen Verteilung und eliminiert ggf. intravasale Thromben (Wittwer et al. 2005).

2.3.3 Präparation Herz-Lungen-Block

Als nächstes wurde das Herz von überflüssigen Gewebe befreit und die Arteria coronaria dextra und sinistra ligiert (0 Vicryl, Ethicon). Die Aorta wurde gekürzt und zugenäht (3-0 Prolene, Ethicon), ebenso wurde die Vena cava (0 Vicryl, Ethicon) sowie die Schnittstelle im

linken Vorhof geschlossen (4-0 Prolene, Ethicon). Dies wurde mit hoher Sorgfalt durchgeführt, um einen späteren Flüssigkeitsverlust aus dem Perfusionskreislauf so gering wie möglich zu halten.

Auf dem linken Ventrikel wurde eine Tabaksbeutelnaht gelegt und nach Incision der Kammer eine LA-Kanüle (32F) in den linken Vorhof geführt. Der Tabaksbeutel wurde zugezogen und die Kanüle zusätzlich mit Merseleneband fixiert. Analog dazu erfolgte das Legen einer 28F-Kanüle durch die rechte Kammer in die Arteria pulmonalis. Abschließend wurden Druckmesssonden im linken Vorhof und in der Arteria pulmonalis positioniert und fixiert.

2.3.4 Vorbereitung des Reperfusion-Systems und Priming

Während der Präparation des Organs wurde gleichzeitig das Reperusionsmodell vorbereitet. Dafür wurde das neue System (Gruppe 2 und 3) mit 2 Flaschen Steen-Solution (Vitrolife, Göteborg, Schweden) a 500ml befüllt. Das offene System (Gruppe 1) benötigte aufgrund des integrierten Reservoirs 3 Flaschen als Startvolumen. Mittels Maschinenklemmen wurde darauf geachtet, dass der Leukozytenfilter retrograd befüllt wurde. Wichtig war vor allem im geschlossenen System (Gruppe 2 und 3), dass das gesamte System frei von Luftblasen war. Abhängig von der Versuchsgruppe wurde zusätzlich zur Steen-Lösung ca. 220-250ml Erythrozytenkonzentrat hinzugegeben. Mittels Blutgasanalysen (ABL 800 Flex, Radiometer GmbH, Deutschland) war ein Ziel-Hämoglobin-Wert von 3g/dl einzustellen (Gruppe 1 und 2).

Der pH wurde mittels Natriumbicarbonat 8,4% (B.Braun, Deutschland) auf einen Wert um 7,4 gepuffert. Zusätzlich wurden 500mg Methylprednisolon in den Kreislauf gegeben.

2.4 Reperusions-Phase

2.4.1 Anschluss an das InVivo-Modell

Der präparierte Herz-Lungen-Block wurde nun an das In-vitro-Modell angeschlossen. Nach Platzierung des Organs im Plexiglkasten (Vitrolife) und Anschluss der Druckmesssonden wurde zunächst die PA-Kanüle mit dem System verbunden. Die Pumpe wurde auf 0,1l/min angefahren und die ersten aus der LA-Kanüle kommenden 200ml verworfen, bevor auch der LA-Schenkel konnektiert wurde. Es galt dabei darauf zu achten, dass die Konnektion nahezu luftfrei erfolgte, um Schäden durch Luftembolien zu vermeiden. Nach vollständigem Anschluss des Organs an das Reperfusionssystem wurde die Temperatur von initialen 21°

Celsius alle 2min um 1° Celsius auf 37° Celsius erhöht. Bei einer Temperatur von 32° Celsius wurde mit der Beatmung begonnen. Die Einstellungen des Beatmungsgerätes waren bis auf einen inspiratorischen Druck von 13 cmH₂O dieselben wie während der In situ-Phase. Der Fluss wurde kontinuierlich erhöht, so dass bei 30min das Organ mit 1 l/min und bei Erreichen der 37° Celsius mit 1,5 l/min perfundiert wurde. Letzter Wert entspricht ca. 50% der HZV im Spendertier.

2.4.2 Messdatenerhebung

Nach folgenden Tabellen wurden die Daten innerhalb der 6 Stunden Reperfusionzeit erfasst. Zu jedem angegebenen Messzeitpunkt wurde die Hämodynamik dokumentiert und jeweils aus dem PA- und LA-Schenkel PICCO-Röhrchen zur Blutgasanalyse entnommen. Zusätzlich wurde Serum aus dem LA-Schenkel entnommen. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 180 und 360min wurden aus beiden Schenkeln EDTA-Röhrchen zur Blutbild- und Leukozytenanzahlbestimmung abgenommen. Alle volle Stunde eine kurzfristige Diskonnektion der Lunge vom Beatmungssystem zur Beurteilung der Kollabierfähigkeit der Lunge. Diese ist Teil des nachfolgend beschriebenen PDI. Ab der dritten Reperfusionstunde wurde der PEEP von 7 auf 10 cmH₂O erhöht, jedoch 10min vor jeder Messung wieder auf 7 cmH₂O reduziert.

Hämodynamik-Parameter:

min		HZV		PA- Druck	LA- Druck	Uhrzeit
0		0,1				
30		1,0				
60		1,5				
120		1,5				
180		1,5				
240		1,5				
300		1,5				
360		1,5				

Tabelle 4: Reperusionsprotokoll

Beatmungs-Parameter:

min	AF	PEEP	fiO2	AHV	Pmax	Pmin	Pplateau	PDI	Uhrzeit
0	16	7	0,5	-	-	-	-		
30	16	7	0,5						
60	16	7	0,5						
120	16	7	0,5						
180	16	7/10	0,5						
240	16	7/10	0,5						
300	16	7/10	0,5						
360	16	7/10	0,5						

Tabelle 5: Beatmungsprotokoll

2.4.3 Pulmonary Deflation Index (PDI)

Zur makroskopischen Beurteilung der Spenderlunge wird der sogenannte pulmonary deflation index (=PDI) benutzt. Dieser wurde zu Beginn der Entwicklung des Perfusionsmodells festgelegt und seitdem kontinuierlich verwendet. Der PDI dient der Beurteilung der Eignung der Spenderlunge zur Transplantation als makroskopische Einstufung der Compliance bzw. des pulmonalen Wassergehaltes. Da der PDI den Ödemgehalt der Lunge widerspiegelt, wurde arbiträr anlehnend an klinische Praxis festgelegt, dass nur ein PDI von 1 und 2 als physiologisch bewertet und somit als Teilkriterium für Transplantabilität betrachtet wurde.

Beurteilt werden dabei makroskopisch die Ödembildung sowie Kollabierfähigkeit der Lunge bei Diskonnektierung des Beatmungsschlauches. Der PDI wurde während der Reperfusionphase stündlich erhoben.

Folgende Gradeinteilung wurde zur Beurteilung bzw. Einstufung festgelegt:

Grad	Kollaps	Ödem (makroskopisch/visuell)
1	Komplett	nein
2	Komplett	interstitiell, ein Lappen
3	Komplett	interstitiell, mehrere Lappen
4	inkomplett	intraalveolar
5	Nein	Regurgitation durch die Trachea

Tabelle 6: Pulmonary Deflation Index

2.4.4 Definitionskriterien "Transplantabilität"

In der klinischen Praxis gibt es verschiedene Einschluss- und Ausschlusskriterien für Spenderlungen von sogenannten „ideal donors“ und auch „extended donors“. Diese wurden bereits oben beschrieben (siehe Tab. 1).

Für unser ex-vivo Lungenperfuisionsmodell wurden diese Kriterien angewandt. Um als mögliche Spenderlunge in Betracht zu kommen, mußten die Organe nach 6h Perfusion stabile Gasaustauschwerte mit einem $\text{PaO}_2 > 300\text{mmHg}$ bei einem FiO_2 von 50%, physiologische Werte des pulmonalarteriellen Druckes (PA) sowie mittleren Beatmungsdruckes (PAP) aufweisen. Die Lungen-Compliance soll stabil sein bzw. ansteigende Dynamik aufweisen. Zusätzlich wurde lediglich eine PDI-Grad von 1 und 2 als transplantabel gewertet.

2.5 Gewebeprobenentnahme und deren Analyse

Von jeder Spenderlunge wurden unmittelbar nach Reperfuisionsende zur mikroskopischen Untersuchung sowie zur Untersuchung der Leukozytenmigration (siehe unten) aus jedem Lungenlappen vier ca. 2x2cm große Gewebeproben entnommen. Ein weiteres fünftes Gewebestück wurde für die Wet-Dry-Ratio verwendet.

2.5.1 Histologie

Die Proben für die histologische Auswertung wurden unmittelbar nach der Entnahme in 3,5-%iges Formaldehyd (BÜFA Chemikalien GmbH&Co KG, Deutschland) gegeben. Sie wurden anschließend innerhalb der nächsten drei Tage in Paraffin gegossen, geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin (HE) und Elastica/van Gieson (EvG) gefärbt. Im Lichtmikroskop (Leica DMIRE2, Wetzlar) wurden die Proben verblindet von zwei unabhängigen Untersuchern mit Hilfe des Lung injury score (LIS) nach Rotta (1999) analysiert. Pro Lungenlappen wurden je 5 Felder in 100x bzw. 400x Vergrößerung hinsichtlich Atelektasen-, Ödembildung, Emphysem sowie alveolären und interstitiellen Infiltration und Zellwanddicke untersucht bzw. entsprechend unten stehendem Schema bewertet:

Lung injury score:

Grad	Ausmaß der Schädigung
1	Keine Schädigung
2	Schädigung <25% pro Gesichtsfeld
3	Schädigung <50% pro Gesichtsfeld
4	Schädigung <75% pro Gesichtsfeld
5	Schädigung >75% pro Gesichtsfeld

Tabelle 7: Lung injury score (LIS)

Schädigung	Vergrößerung	Schädigung	Vergrößerung
Atelektase	100x	Alveoläre Infiltration	400x
Ödem	100x	Interstitielle Infiltration	400x
Emphysem	100x	Wanddicke	400x

Tabelle 8: Schädigungsart und Vergrößerung

2.5.2 Wet-Dry-Ratio

Die Wet-dry-Ratio bzw. das Nass-Trockengewicht ist ein weiterer Parameter zur Quantifizierung der Ödembildung in der Lunge.

Hierzu wurde während des Versuchs, d.h. in der Präexplantationsphase nach Thoraxöffnung eine sogenannte „Prae-Probe“ (ca. 0,5x0,5cm) aus dem linken Mittellappen gewonnen. Am Ende des Versuchs wurden nach Perfusionsstopp aus jedem Lungenlappen ein ca. 2x2cm großes repräsentatives Gewebestück geschnitten. Das Gewicht der Proben wurde mit einer Präzisionswaage ermittelt. Anschließend wurden alle Proben in einem Wärmeschrank (Julabo Biotherm 37) bei 60° Celsius für weitere 48h und 72h getrocknet und erneut gewogen. Die Verhältnisse Nass- zu Trockengewicht, d.h. Prae/48h bzw. Prae/72h, wurden berechnet und erlaubten somit Auskunft über den Grad der Ödembildung bzw. Wassergehalt des Gewebes.

2.5.3 MPO-Assay

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein für neutrophile Granulozyten spezifisches Enzym, welches aber auch in geringen Mengen in Monozyten oder anderen gewebsansässigen Makrophagen nachweisbar ist. Es ist in den azurophilen Granula der Zellen lokalisiert und dient diesen vornehmlich zur Pathogenabwehr, indem es Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Chloridionen zu hypochloriger Säure katalysiert. Die hypochlorige Säure ist ein starkes Oxidans und verantwortlich für diese mikrobioziden Eigenschaften. Diese Reaktion ist unter den Säugetierenzymen einzigartig.

Weiterhin hat die Myeloperoxidase auch vaskulär pro-inflammatorische Eigenschaften. Das Enzym oxidiert in nicht unerheblichem Ausmaß NO und schränkt somit die vasoaktiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften von NO ein, was sich wiederum in einer veränderten Hämodynamik äußert.

Zur Bestimmung der MPO-Menge im Gewebe sind mehrere Schritte notwendig. Die 2x2cm großen Proben wurden aus jedem Lungenlappen entnommen und noch im Tier-OP zur Aufbewahrung mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Im Folgenden werden die weiteren erforderlichen Arbeitsschritte beschrieben.

Homogenisierung:

Zunächst mussten die Proben homogenisiert und ihr Gesamtproteinanteil photometrisch bestimmt werden. Hierzu wurden zermörserte 2mm große Proben in Eppendorf-Röhrchen (2ml SafeLock Tubes, Eppendorf) zusammen mit einer Stahlkugel (stainless steel beads 5mm, Quiagen) gegeben. Weiterhin wurde 300µl eines Puffer dazugegeben, der aus 10ml Homogenisierungspuffer (121g TRIS-HCL, 4,28g Sucrose, 0,057g EGTA, 0,292g EDTA) sowie 50µl PMSF, 50µl Tritin X (Triton X-100, Sigma) sowie einer Inhibitorenmix-Tablette (10µl Leupeptin 5mg/ml, 10µl Papstatin 2mg/ml, 100µl Aprotinin 1mg/ml) bestand. Nach zweimaliger Zerkleinerung (je 1min bei einer Frequenz von 30/s) im Tissue-Lyser (Quiagen) wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810R, Eppendorf) bei 4°C und 10.000rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der abpipettierte Überstand wurde in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen überführt und konnte so entweder zur weiteren Aufbewahrung tiefgefroren oder gleich weiterverarbeitet werden.

Proteinbestimmung und Faktorberechnung:

In einem nächsten Schritt erfolgte die Proteinmengenbestimmung und Faktorerrechnung. Es wurde ein Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. So wurden 5µl des vorher gewonnenen Überstandes mit 245µl des bereits erwähnten Puffers gemischt, um eine 1:50 Verdünnung zu erzielen. Nun wurden jeweils 25µl dieses Gemisches auf eine 96-Well-Platte im Doppelausatz aufgebracht und mit jeweils 200µl der zuvor angesetzten working-Reagenz des Kits komplettiert. Das Aufbringen der im Kit enthaltenen Standards erfolgte analog. Die in der working-Reagenz enthaltene Tartrathaltige Bicinchoninsäure- und Kupfersulfat-Lösung reagiert in einer Biuret-Reaktion zu einem bläulichen Chelatkomplex. Nach 30min Inkubationszeit bei 37°C im Wärmeschrank wurden die Proben für 10min bei 4°C gekühlt und anschließend in einem „plate-reader“ eines Computers photometrisch bei 562nm quantifiziert. Mit den erhaltenen Werten konnte eine Standardkurve und somit die Menge des Proteingehaltes pro Probe berechnet werden.

MPO-Gehaltbestimmung:

In einem weiteren Schritt wurde dann mit Hilfe eines MPO-Assay (MPO-412, Applied Bioanalytical Labs, Sarasota, USA) die MPO-Menge photometrisch bestimmt, mittels des vorher ermittelten Faktors in Relation zur Gesamtproteinmenge gesetzt und ausgewertet.

Das im Folgenden beschriebene Nachweisverfahren beruht auf einem Prinzip, welches bereits 1982 von Weiss et al. beschrieben worden ist. Maßgeblich ist die Reaktion, bei der die hypochlorige Säure durch β -Aminotaurinsäure zu Taurinchloramin übergeht. Durch Zusatz

von Thionitrobenzoesäure (TNB), das einen gelben Farbton besitzt, reagiert das Taurinchloramin zu Dithionitrobenzoesäure (DTNB), welches wiederum farblos ist. Der Abfall der Absorption kann bei 412nm gemessen werden und gibt Auskunft über die ursprüngliche MPO-Aktivität. Eine Einheit ist dabei definiert als die MPO-Menge, die 1nmol des Taurinchloramin bei einem pH = 6,5 und 25°C im Zeitraum von 30 Minuten in Gegenwart von 100mmol Chlorid und 100µmol H₂O₂ produziert.

Die Proben werden über den gesamten Zeitraum auf einem Thermomixer (Thermomixer comfort 1,5ml, Eppendorf) bei 25°C geschüttelt. Zunächst wurden 880µl des Assay Puffers sowie 80µl der eigentlichen Probe in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Nach 5min wurde zu jeder Probe 40µl Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben und für weitere 30min auf dem Thermomixer belassen. Es folgten je 40µl Katalase für 5min Einwirkungszeit, um die Reaktion durch Elimination der H₂O₂ zu stoppen sowie im letzten Schritt 100µl TNB-Lösung für weitere 20min. Abschließend wurden nach Eichung des Photometers mit den blank-Proben die einzelnen Proben bei 412nm photometrisch ausgelesen.

2.6 Vorversuche und außerplanmäßige Versuche

2.6.1 Vorversuche 1-3

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden vorab drei Vorversuche durchgeführt mit dem Ziel, das neue System (geschlossen) zu testen und um Erfahrung im Umgang mit der neuen Technik zu erlangen. Im Wesentlichen unterschied sich der Ablauf der Versuche nicht von dem der drei Versuchsgruppen. Jedoch musste aufgrund von Auflagen der Ethikkommission vor der Thorakotomie die Tötung des Versuchstiers erfolgen. Die Versuchstiere wurden mit einer hohen Dosis Pentobarbital (30-40ml) euthanasiert. Da die Tötung des Tieres vor der Sternotomie erfolgen musste, wurde, um die Zeit der warmen Ischämie in Grenzen zu halten, eine intrathorakale Kühlung mit isotoner Natriumchlorid-Lösung über vier Thoraxdrainagen durchgeführt.

Außerdem wurde eine neue Kanüle (Vitrolife, Schweden) getestet, deren Anschluss vorher chirurgisch erprobt werden sollte. Diese sollten aufgrund ihrer Trichterform erlauben, das Herz oberhalb der Klappenebene entlang der atrio-ventrikulären Sulci abzusetzen. Der Trichter wurde mit dem linken Vorhof anastomosiert (3-0 Prolene, Ethicon). Die 28-F-Kanüle für die Pulmonalarterie wurde zweifach mit Merselenband gesichert. Letztendlich wurde diese Kanüle aufgrund des technischen und zeitlichen Mehraufwandes (Resektion der Ventrikel, Einnähen der Trichterkanüle) lediglich dreimal (in Gruppe 2) verwendet, da keine

ausreichende Dichtigkeit erzielt werden bzw. ein konstanter Verlust von Perfusionsvolumen nicht vermieden werden konnte.

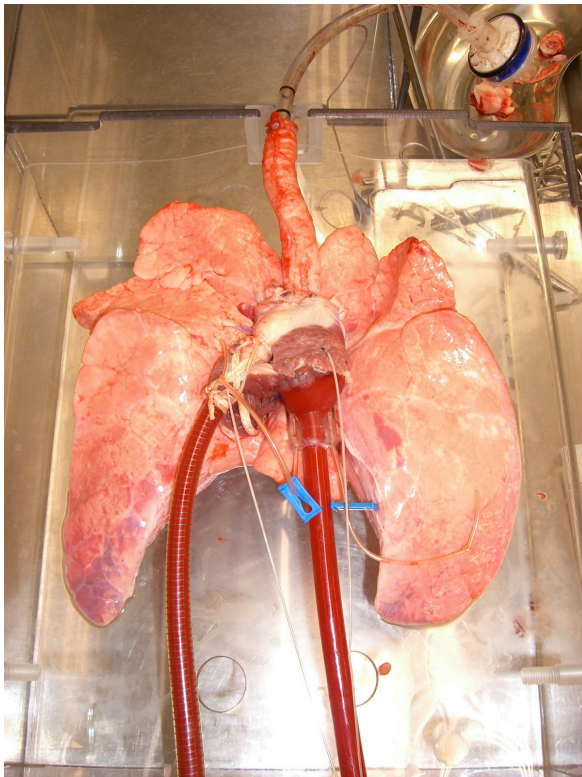


Abbildung 6: Organ mit Kanüle

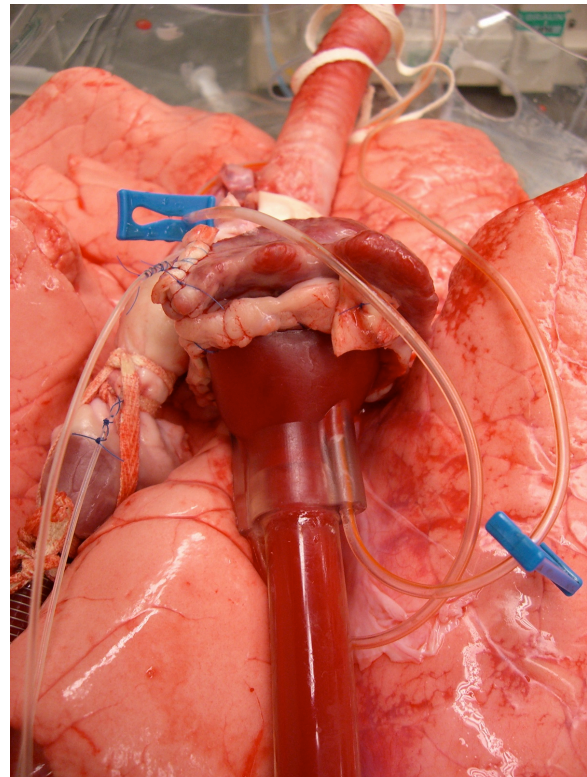


Abbildung 7: Kanüle

2.6.2 Steen-Versuche

Bevor die Versuche der Gruppe 3 durchgeführt wurden, ist die Reperfusion mit reiner Steen-Lösung an zwei Versuchstieren getestet worden. Bevor eine komplette Gruppe mit weiteren 6 Versuchstieren etabliert wurde, wollte man so erst einmal die Machbarkeit dieser Perfusionsmethode erproben. Die beiden Versuche erfolgten nach identischem Protokoll wie die Kontrollgruppe (Gruppe 1) bzw. Gruppe 2 und endeten nach einer Reperfusionsdauer von 6h. Eine histologische Untersuchung sowie die Bestimmung der wet-dry-ratio erfolgten nach bekanntem Schema.

2.7 Statistische Methoden

Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit dem Programm RStudio (Version 0.98.1087). Es wurde hierzu ein komplexes Modell erstellt. Für die einzelnen Parameter wurde jeweils ein Grundmodell aufgestellt, welches die Messzeitpunkte im Verlauf miteinander vergleicht (ohne Baselinemessung), um somit gruppenspezifische Unterschiede

zu erkennen. Zudem wurde ein Modell aufgestellt, welches die Baseline-Messung mit den einzelnen Messzeitpunkten verglich. Ein Nullmodell wurde erstellt, in dem alle Versuchstiere ohne Gruppenzuordnung beinhaltet sind. Mittels Varianzanalyse (ANOVA) wurden dann die Baseline-Gruppen-Modelle mit den Nullmodellen verglichen, um statistische Signifikanzen zu ermitteln.

Die Analyse der MPO-Assay wurde in einem mixed-model mittels SPSS Trial Version 22 errechnet.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden entsprechend der jeweiligen Fragestellung die Ergebnisse erläutert, d.h. die Ergebnisse der Gruppe 1 und 2 werden miteinander verglichen, ebenso erfolgt der Vergleich zwischen Gruppe 2 und 3. Abschließend wird auf ausgewählte Ereignisse des Elektrolythaushaltes bzw. des Stoffwechsels eingegangen.

3.1 Allgemeine Beobachtungen

Die Länge der warmen Ischämiezeit lag im Durchschnitt bei 91,4 Minuten (Standardabweichung=24,3). Unter „warmen Ischämiezeit“ ist die Zeitspanne zwischen Abklemmen der Aorta bei Explantation bis Beginn der Reperfusion im ex-vivo-Modell zu verstehen. Sehr gut lässt sich ein Trend in Richtung Verkürzung dieser Ischämiezeit erkennen, der neben einem Lerneffekt teilweise auch auf die neuen Trichterkanülen zurückzuführen sein dürfte. So sind die Ischämiezeiten in der Gruppe 3 im Mittel circa 15min kürzer als in Gruppe 2.

Wie bereits erwähnt ist der Einsatz der neuen Kanülen der Firma Vitrolife, die ein Absetzen des Herzmuskels oberhalb der Klappenebene bei der Explantation erlauben sollen, kritisch zu betrachten. Diese wurde bei den Vorversuchen und bei den ersten drei Versuchen der Gruppe 2 verwendet. Es zeigte sich im Verlauf, dass die neuen Kanülen neben einer längeren Ischämiezeit aufgrund aufwendigerer Präparationstechnik einige Probleme bei der Dichtigkeit aufwiesen. Auch bei sorgfältiger überlappender Nahttechnik mit 3-0 Prolene-Fäden konnte der linke Vorhof nicht adäquat mit der Kanüle anastomosiert werden. Gerade aus den Einstichstellen am Trichterleckte das System und es kam zu teils erheblichen Volumenverlusten. Auch die Verwendung dünnerer Fäden (4-0 oder 5-0 Prolene) verbesserte die Situation nicht, sondern erschwerte vornehmlich wegen der dünneren Nadel aufgrund der Materialbeschaffenheit und Dicke der Kanüle die Anastomosierung. Aufgrund dieser Probleme sind wir ab dem vierten Versuchstier in Gruppe 2 wieder auf die alte Technik umgestiegen, bei der das gesamte Herz an der Lunge belassen wird und für die Reperfusion durch den Herzmuskel kanüliert wird.

Außerdem ist aufgefallen, dass gerade am Anfang der Reperfusionsphase beim geschlossenen System Volumenschwankungen aufgetreten sind, die trotz Reservoirbeutel nicht immer suffizient aufgefangen werden konnten und zu kurzzeitigen Verzögerungen im Protokoll bei der Erhöhung der Flussgeschwindigkeit geführt haben. Hier erweist sich das alte System mit größeren Volumenreserven in der Handhabung einfacher.

Ein weiterer Punkt stellt die teilweise deutliche Entgleisung der Elektrolyte und Stoffwechselprodukte wie Laktat dar. Darauf soll noch einmal gesondert im Abschnitt 3.4 eingegangen werden.

3.2 Ergebnisse offenes versus geschlossenes System

3.2.1 Conclusio

Beim Vergleich des offenen Systems (Gruppe 1) mit dem geschlossenen System (Gruppe 2) zeigt sich kein zusätzlicher Nutzen durch die Veränderungen der Systemkomponenten. Beide Systeme erlauben eine sichere Langzeitperfusion über den Zeitraum von 6h. Bei Anwendung der Transplantabilitätskriterien erfüllten in Gruppe 1 alle Versuchslungen (n=7), in Gruppe 2 jedoch nur 4 von 6 Lungen die Anforderungen. Nachfolgend die Ergebnisse im Einzelnen:

3.2.2 Respiratorische Parameter

3.2.2.1 Oxygenierung

Zur Bewertung des Gasaustausches wurden nach oben vorgestelltem Schema kontinuierlich Blutgasanalysen aus den PA- und LA-Schenkeln des Reperfusionssystems zur Partialdruckbestimmung von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid durchgeführt. Alle Werte wurden bei einem Sauerstoffanteil von 50% in der Beatmungsluft gemessen. Anhand dieser Werte kann die pulmonale Oxygenierungskapazität (POC) errechnet werden. Sie gibt Auskunft über die Fähigkeit der Lunge, das Blut mit Sauerstoff anzureichern.

Die POC wird wie folgt berechnet:

$$POC = \frac{LApO_2}{f_iO_2} - \frac{PApO_2}{f_iO_2} \quad (\text{in mmHg})$$

Legende:

LApO₂ = Sauerstoffpartialdruck linker Vorhof

PApO₂ = Sauerstoffpartialdruck Pulmonalarterie

f_iO₂ = Sauerstoffanteil in Beatmungsluft (0,5 = 50%)

LApO ₂ /fiO ₂ - PapO ₂ /fiO ₂		
Messzeitpunkt	Gruppe 1	Gruppe 2
Prae	277,5 ± 73,2	346,8 ± 65,4
30 min	349,3 ± 55,5	349,6 ± 41,0
60 min	379,0 ± 44,0	395,8 ± 73,6
120 min	383,7 ± 30,2	404,9 ± 57,0
180 min	378,1 ± 25,7	375,3 ± 51,7
240 min	380,0 ± 40,6	364,3 ± 60,2
300 min	384,2 ± 25,4	365,0 ± 70,1
360 min	371,1 ± 52,0	349,1 ± 67,7

Tabelle 9: POC Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

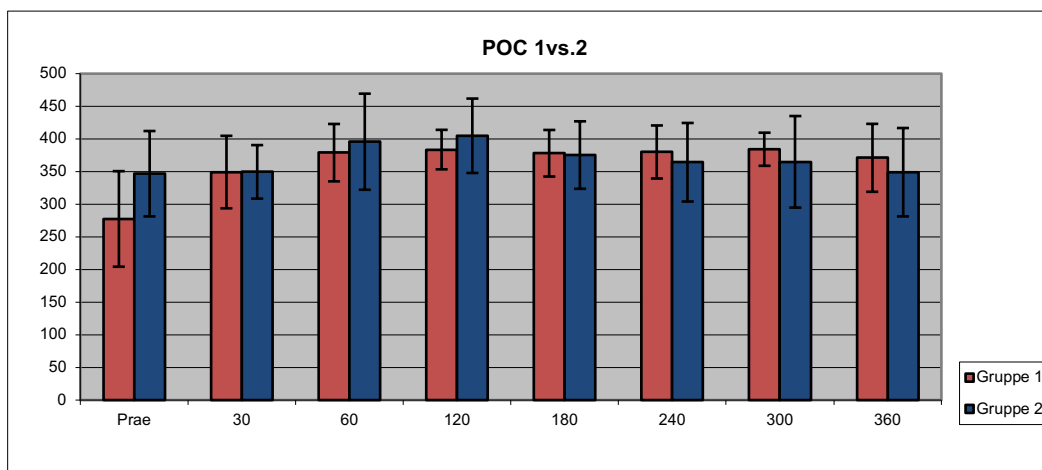


Abbildung 8: POC Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Die Tabelle 9 und die Abbildung 8 zeigen, dass in beiden Gruppen eine konstante Oxygenierungsfunktion vorhanden ist. Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) entwickelt sich in den letzten drei Perfusionsstunden etwas besser, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant (p-Wert = 0.804).

3.2.2.2 CO₂-Eliminierung in der Spenderlunge

Neben der Oxygenierungsfunktion hat die Lunge auch die Aufgabe Kohlendioxid (CO₂) zu eliminieren. Der im ex-vivo-Modell eingebaute Deoxygenator simuliert durch CO₂-NO-Gaszuführung den Sauerstoffverbrauch und die CO₂-Entstehung im Körperkreislauf. Mittels unten aufgeführter Formel kann diese Funktion überprüft werden.

Formel:

$$CO_2 - \text{Differenz} = PApCO_2 - LApCO_2 \quad (\text{in mmHg})$$

Legende:

PApCO₂ = Kohlendioxidpartialdruck Pulmonalarterie

LApCO₂ = Kohlendioxidpartialdruck linker Vorhof

PApCO ₂ -LApCO ₂ (mmHg)		
Messzeitpunkt	Gruppe 1	Gruppe 2
Prae	5,6 ± 4,5	5,2 ± 2,4
30 min	17,8 ± 12,0	10,0 ± 11,4
60 min	11,7 ± 5,2	10,3 ± 3,9
120 min	12,7 ± 1,9	11,0 ± 1,9
180 min	13,0 ± 1,9	10,9 ± 1,4
240 min	11,0 ± 2,0	10,2 ± 1,7
300 min	12,3 ± 2,9	9,2 ± 1,9
360 min	11,9 ± 2,7	10,2 ± 2,1

Tabelle 10: CO₂-Differenz Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Die gemessenen Werte zeigen, dass sich die Gruppen bei der CO₂-Eliminierung des Blutes kaum unterscheiden und innerhalb ihrer Gruppe konstante Werte halten. Innerhalb einer Gruppe zeigen sich die Verlaufskurven der Einzeltiere homogen. Gruppenübergreifend besteht jedoch ein signifikanter Unterschied in der Decarboxylierung (p-Wert = 0.0018), d.h. es besteht ein Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2.

Die im Tier gemessene (in situ) Präwert-Differenz ist niedriger als die anschließend errechneten Differenzen im ex-vivo-Modell, was auf die artifizielle Zuführung von CO₂ im Reperfusionssystem zurückzuführen ist. Die absoluten Werte von PApCO₂ als auch LApCO₂ waren in situ höher und fielen ex vivo deutlich ab.

3.2.2.3 Atemhubvolumen und Beatmungsdruck

Der durchschnittliche Beatmungsdruck (Pmean) ist eine am Beatmungsgerät voreingestellte Größe. In Relation dazu zeigen sich die Atemhubvolumina bei den Versuchstieren. Auf die detaillierte Darstellung der durchschnittlichen Beatmungsdrücke soll an dieser Stelle verzichtet werden, da diese innerhalb der Gruppen und auch gruppenübergreifend konstant waren. Ähnlich verhält es sich mit den Atemhubvolumina.

Die Betrachtung und Interpretation der aus beiden Parametern berechenbare Größe, die sogenannte Compliance, ist für die Fragestellung geeigneter und aussagekräftiger. Die Compliance wird daher im folgenden Unterpunkt dargestellt.

3.2.2.4 Statische Compliance

Die Compliance beschreibt und quantifiziert die Dehnbarkeit der Lunge und ist somit ein wesentliches Beurteilungskriterium der Integrität des Lungengewebes. Sie kann durch folgende Formel wiedergegeben werden:

$$\text{Statische Compliance} = \frac{AHV(ml)}{P_{mean}(mmHg)}$$

Legende:

AHV = Atemhubvolumen

P_{mean} = mittlerer Beatmungsdruck

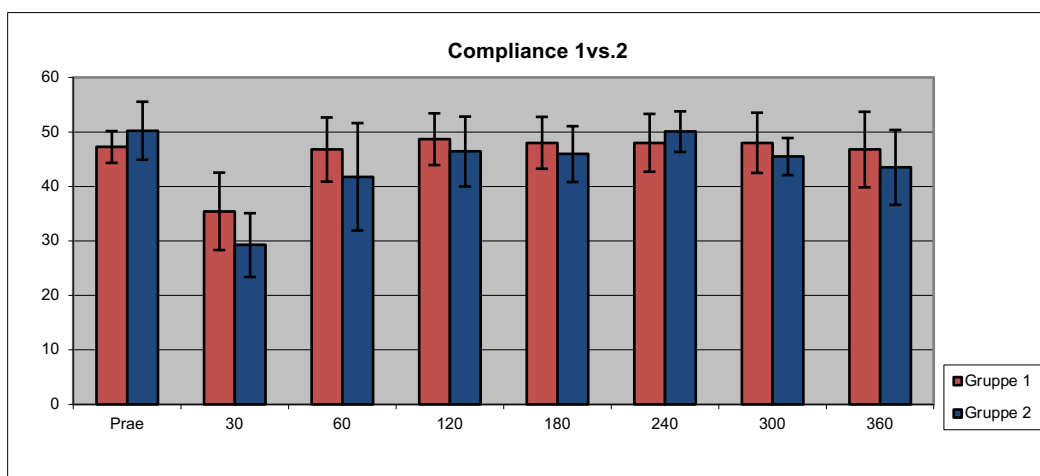


Abbildung 9: Compliance Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Bei Betrachtung der Abbildung 9 fällt auf, dass in der Reperfusionphase die Compliance der Kontrollgruppe im Mittel geringfügig - jedoch nicht signifikant - höher ist.

Die niedrigeren Werte beim 30min-Messzeitpunkt sind durch die gerade erst begonnene Beatmung und der dadurch noch nicht vollständig entfalteten Lungenabschnitte erklärbar. Laut Protokoll startet die Beatmung erst bei 32°C bzw. ca. 24min nach Reperfusionbeginn.

In der statistischen Aufarbeitung der Compliance zeigt sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht (p-Wert = 0.0824).

3.2.3 Hämodynamische Parameter

3.2.3.1 PA- und LA-Druck

Die in der Pulmonalarterie (PA) und im linken Vorhof (LA) gemessenen Drücke sind in nachfolgenden Abbildungen aufgeführt.

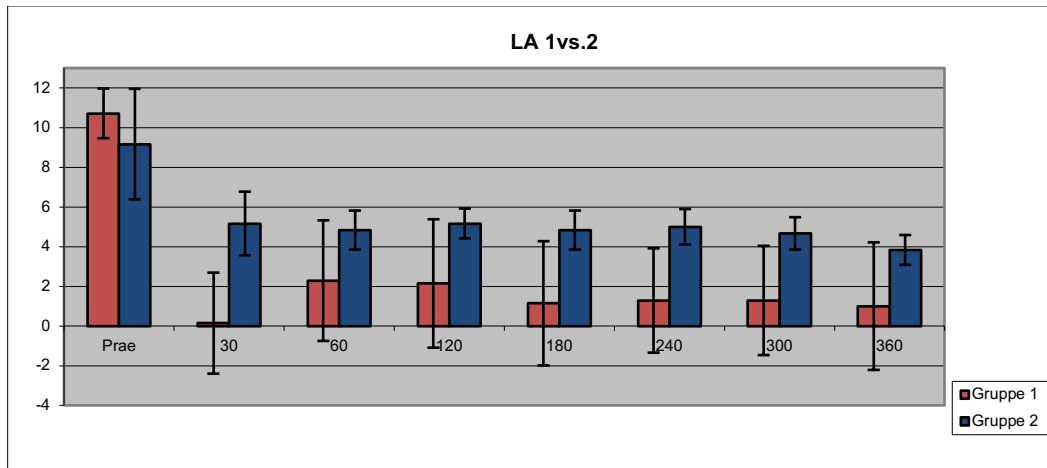


Abbildung 10: LA-Druck Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Abgesehen von ähnlichen Prae-Werten sind die Drücke im linken Vorhof (LA) bei Gruppe 2 höher. Dieser Umstand ist durch das geschlossene System an sich und das Fehlen des Reservoirbehälters erklärbar. In Gruppe 1 sind die Mittelwerte geringer, jedoch ist die Streuung und somit die Standardabweichung größer.

Die Pulmonalarteriendrucke (PAP) sind dagegen sehr ähnlich. In beiden Gruppen ist im Verlauf der Reperfusionphase ein Anstieg der Drücke erkennbar. Nach sechsstündiger Perfusion liegen die Werte wieder auf Höhe der Prae-Werte, die im geschlossenen Thorax des Versuchstieres gemessen wurden.

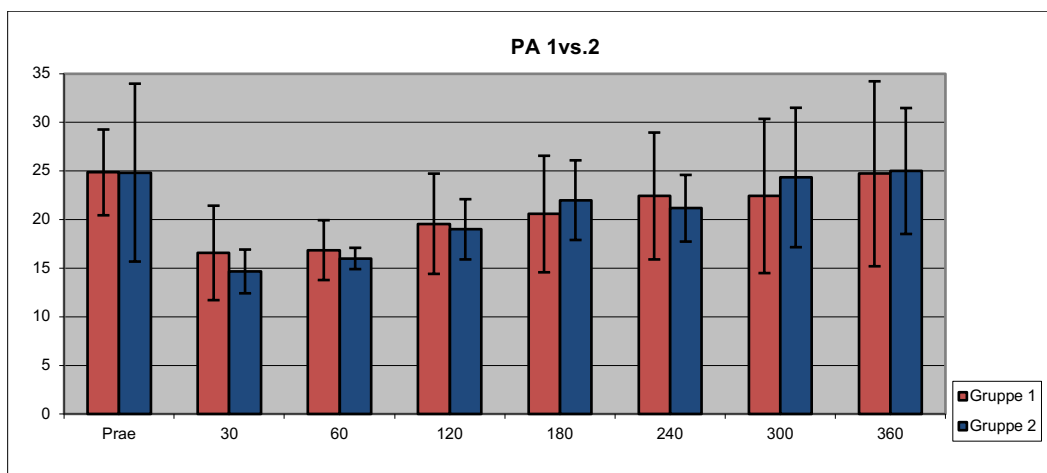


Abbildung 11: PA-Druck Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Statistisch gesehen besteht zwischen Gruppe 1 (rot) und Gruppe 2 (blau) kein relevanter Unterschied.

3.2.3.2 Pulmonaler Gefäßwiderstand

Der Gefäßwiderstand im Pulmonalkreislauf spiegelt die Vasoreaktivität des Lungengewebes wider. Er ist als Verhältnis der Druckdifferenz von Pulmonalarterie und linkem Vorhof zum Herzzeitvolumen definiert und berechnet sich wie folgt:

$$PVR = \frac{PA - LA}{HZV} \times 79,8 \quad (\text{dyn} * \text{s} * \text{cm}^{-5})$$

Legende:

PVR = pulmonary vascular resistance

PA = pulmonalarterieller Druck

LA = linksatrialer Druck

HZV = Herzzeitvolumen

In situ (Prae-Wert) wurde der PVR mittels der durch den SwanGanz-Katheter erhobenen Werte, im ex-vivo-Modell direkt über Messsonden bestimmte Werte errechnet.

Ausgehend von nahezu gleichen Prae-Werten ist anhand der folgenden Abbildungen zu erkennen, dass alle Werte in der Reperfusionphase deutlich über ihren Ausgangswerten liegen und auch im Verlauf weiter ansteigen. Der pulmonalvaskuläre Widerstand ist im Mittel in Gruppe 2 niedriger, zwischen Gruppe 1 und 2 besteht jedoch zu den jeweiligen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied.

PVR (dyn*s*cm ⁻⁵)		
Messzeitpunkt	Gruppe 1	Gruppe 2
Prae	193,5 ± 97,1	203,5 ± 81,8
30 min	1231,2 ± 376,7	758,1 ± 206,6
60 min	718,2 ± 176,3	594,1 ± 97,6
120 min	858,8 ± 352,5	735,9 ± 148,3
180 min	1005,1 ± 404,6	913,3 ± 213,9
240 min	1086,8 ± 407,3	860,1 ± 148,3
300 min	1096,3 ± 501,4	1046,3 ± 368,1
360 min	1223,6 ± 544,3	1126,1 ± 379,8

Tabelle 11: PVR Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

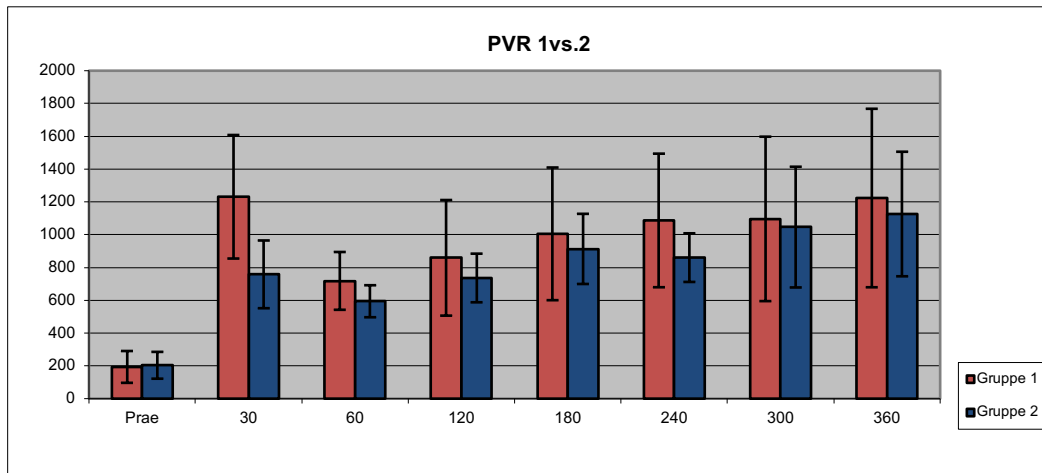


Abbildung 12: PVR Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.2.4 Intrapulmonaler Wassergehalt

3.2.4.1 PDI

Der pulmonary deflation index (PDI) dient wie oben bereits beschrieben der makroskopischen Beurteilung der Spenderlunge. Nur PDI-Werte von 1 und 2 wurden für die Spenderorgane als transplantabel festgelegt. Höhere Werte dagegen deuten auf eine Schädigung der Lunge hin.

Im offenen System (Gruppe 1) sind die Werte bis zur vierten Reperfusionstunde optimal, erst dann steigen sie leicht an. In dieser Gruppe wurden alle Versuchslungen als transplantabel eingestuft.

In Gruppe 2 dagegen ist der PDI von Beginn an im Mittel eine Bewertungseinheit schlechter. Von den 6 Spenderlungen wurden 2 als nicht transplantabel eingeordnet, da sie in der sechsten Stunde einen PDI von 3 aufwiesen.

Messzeitpunkt	PDI	
	Gruppe 1	Gruppe 2
30 min	1,0 ± 0	2,17 ± 0,26
60 min	1,0 ± 0	2,17 ± 0,26
120 min	1,0 ± 0	1,92 ± 0,58
180 min	1,0 ± 0	1,92 ± 0,58
240 min	1,14 ± 0,38	1,83 ± 0,52
300 min	1,14 ± 0,38	2,25 ± 0,52
360 min	1,43 ± 0,53	2,42 ± 0,58

Tabelle 12: PDI Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

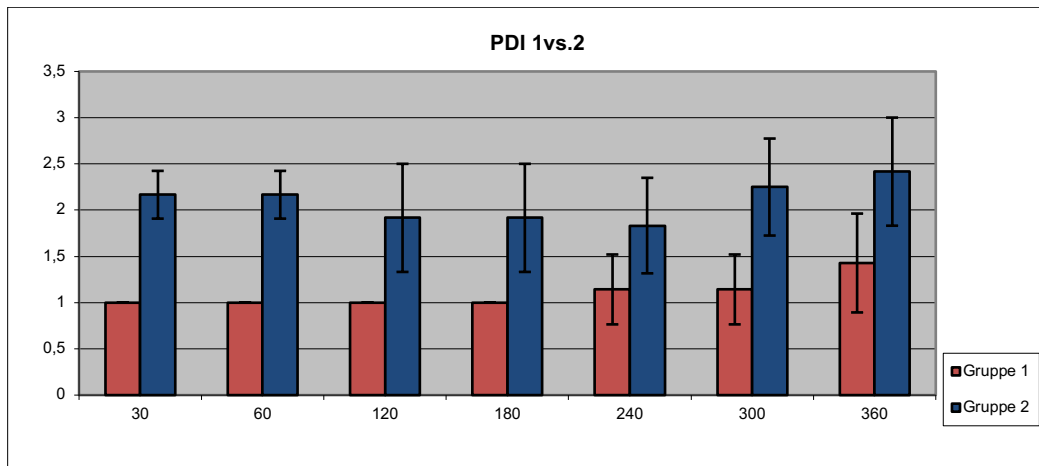


Abbildung 13: PDI Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

In der statistischen Aufarbeitung zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der PDI-Werte in den Zeitpunkten 30min bis 180min ($p < 0,05$). In den Messzeitpunkten 240min, 300min und 360min besteht keine Signifikanz mehr (p -Wert = 0.0706).

3.2.4.2 Wet-dry-ratio

Die Auswertung der wet-dry-ratio ergab einen signifikanten Unterschied zwischen dem offenen und geschlossenen System (p -Wert = 0,00029). Der Mittelwert der Gesamt-wet-dry-ratio in Gruppe 1 liegt bei 3,46 +/- 1,07. In Gruppe 2 beträgt das Nass-Trockengewichtsverhältnis aller Lungenlappen 4,8 +/- 0,37.

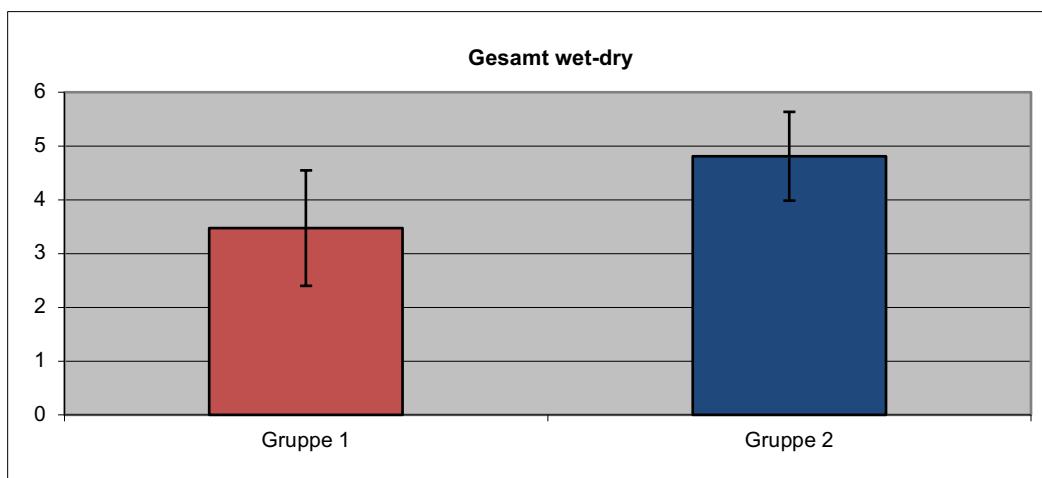


Abbildung 14: Gesamt-wet-dry-ratio Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Nachfolgend sind die Mittelwerte mitsamt Standardabweichung beider Gruppen aufgeführt.

Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio		
Lappen	Gruppe 1	Gruppe 2
LOL	3,1 ± 1,1	4,9 ± 1,0
LML	3,5 ± 1,0	4,7 ± 0,6
LUL	3,9 ± 1,3	4,8 ± 0,2
ROL	3,3 ± 1,0	4,4 ± 0,8
RML	3,6 ± 1,3	5,2 ± 1,3
RUL	3,2 ± 0,5	4,6 ± 0,4

Tabelle 13: Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio (Mittelwert und Standardabweichung)

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse beider Gruppen noch einmal nach der statistischen Aufarbeitung dargestellt. Auch hier ist ersichtlich, dass das offene Reperfusionssystem einen positiven Effekt auf den Grad der Ödembildung hat.

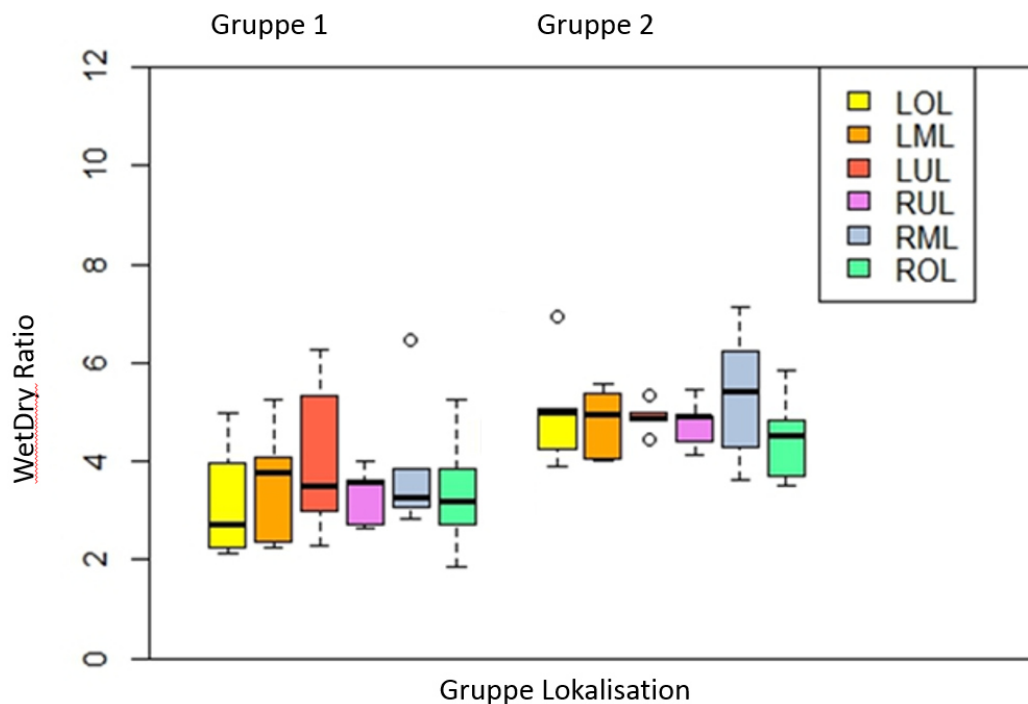


Abbildung 15: Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio Gruppe 1 vs. 2

(LOL=linker Oberlappen, LML=linker Mittellappen, LUL=linker Unterlappen; ROL=rechter Oberlappen, RML=rechter Mittellappen, RUL=rechter Unterlappen)

3.2.5 Analyse der Gewebeproben

3.2.5.1 Histologie

Die Untersuchung der histologischen Proben ergab folgende Werte:

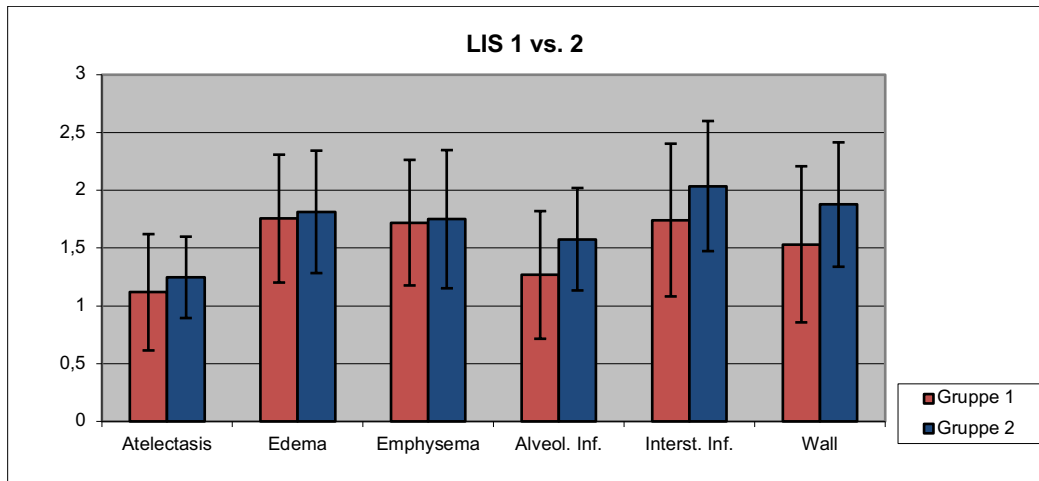


Abbildung 16: Lung Injury Score Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

Konkret bedeutet dies, dass wir bei der histologischen Untersuchung keine relevanten Unterschiede zwischen dem offen und dem geschlossenen Reperfusionssystem feststellen konnten. Alle erhobenen Parameter weisen nur eine minimale Veränderung auf.

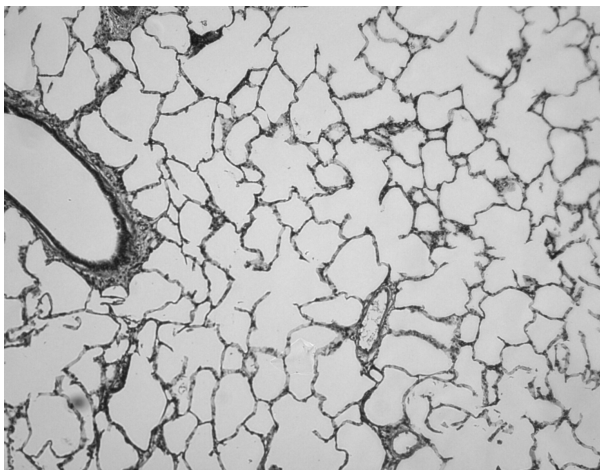


Abbildung 17: Nativpräparat Gruppe 1

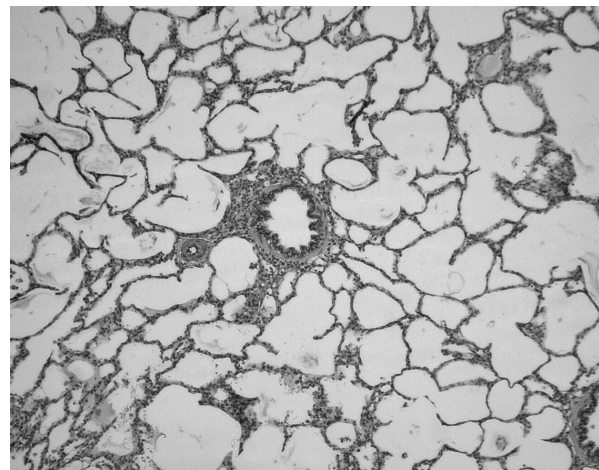


Abbildung 18: Nativpräparat Gruppe 2

3.2.5.2 MPO

Bei Analyse der Myeloperoxidase-Auswertung zeigt sich, dass sowohl bei der Gruppe (p-Wert = 0.007) als auch bei der Lokalisation (p-Wert = 0.033) im Vergleich zum prae-Wert ein signifikanter Unterschied besteht. Werden beide Parameter kombiniert analysiert, besteht

jedoch kein signifikanter Unterschied mehr (p -Wert = 0.993). Zwischen der Gruppe 1 und 2 besteht kein signifikanter Unterschied (p -Wert = 0.514).

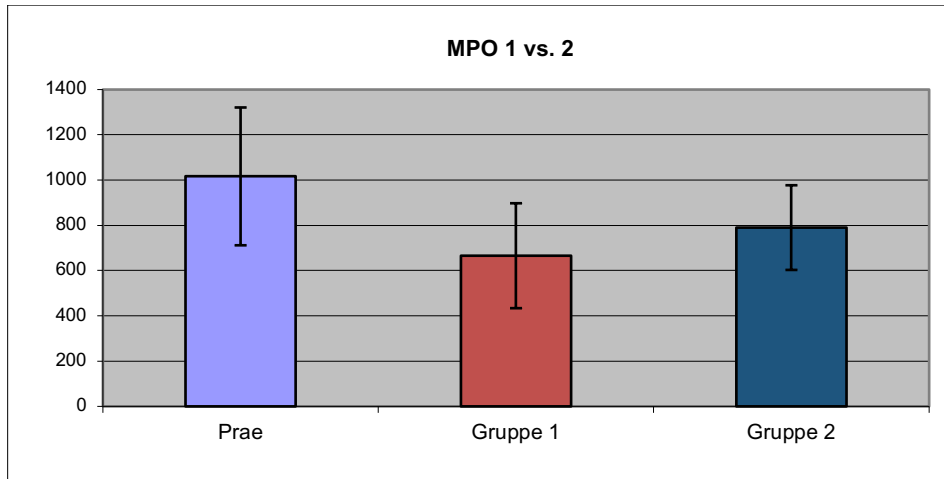


Abbildung 19: MPO gesamt Gruppe 1 vs. 2 (in U/l)

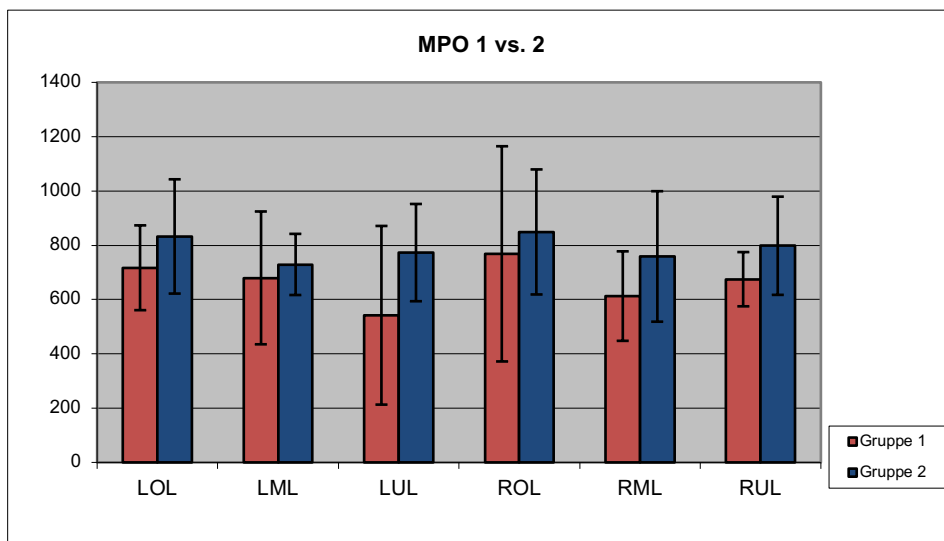


Abbildung 20: MPO lappenbezogen Gruppe 1 vs. 2 (Mittelwert und Standardabweichung)

(LOL=linker Oberlappen, LML=linker Mittellappen, LUL=linker Unterlappen; ROL=rechter Oberlappen, RML=rechter Mittellappen, RUL=rechter Unterlappen)

3.3 Ergebnisse zellhaltiger versus zellfreier Perfusion

3.3.1 Conclusio

Der Vergleich von Gruppe 2 und 3 zeigt, dass eine Perfusion der Versuchslungen mit zellfreier Lösung einen Vorteil bei der Reduzierung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) und somit auch des PVR bringt. In beiden Gruppen konnte keine 100%-ige Transplantabilität erreicht werden, in Gruppe 2 erfüllten nur vier von sechs, in Gruppe 3 erfüllen sieben von acht Versuchslungen die Kriterien. Nachfolgend wieder die Ergebnisse im Einzelnen:

3.3.2 Respiratorische Parameter

3.3.2.1 Oxygenierung

$$POC = \frac{LApO_2}{fiO_2} - \frac{PApO_2}{fiO_2} \quad (\text{in mmHg})$$

Legende:

LApO₂ = Sauerstoffpartialdruck linker Vorhof

PApO₂ = Sauerstoffpartialdruck Pulmonalarterie

fiO₂ = Sauerstoffanteil in Beatmungsluft (0,5 = 50%)

Beim Vergleich der Gruppen 2 und 3 bzw. Erythrozytenkonzentratgemisch versus zellfreier Perfusion zeigt sich beim Oxygenierungskoeffizienten kein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0.804). Verglichen mit den Prae-Werten bleiben die Oxygenierungswerte während der Reperfusion auf einem relativ konstanten Niveau.

LApO 2/fiO2 - PapO2/fiO2		
Messzeitpunkt	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	346,8 ± 65,4	335,1 ± 67,7
30 min	349,6 ± 41,0	281,5 ± 117
60 min	395,8 ± 73,6	357,5 ± 60,8
120 min	404,9 ± 57,0	403,1 ± 38,8
180 min	375,3 ± 51,7	413,8 ± 39,7
240 min	364,3 ± 60,2	425,3 ± 37,8
300 min	365,0 ± 70,1	387,3 ± 27,9
360 min	349,1 ± 67,7	363,9 ± 63,9

Tabelle 14: POC Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

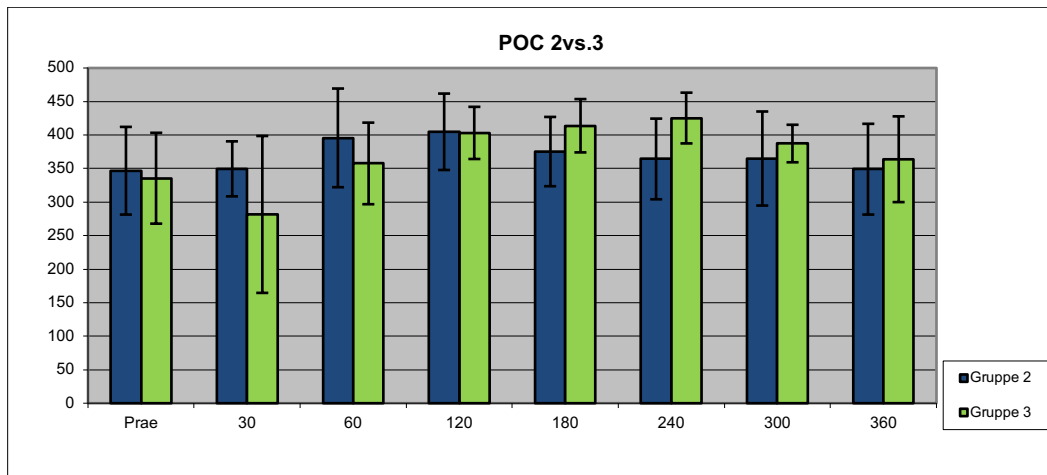


Abbildung 21: POC Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.3.2.2 CO₂-Eliminierung in der Spenderlunge

$$CO_2 - \text{Differenz} = PApCO_2 - LApCO_2 \quad (\text{in mmHg})$$

Legende:

PApCO₂ = Kohlendioxidpartialdruck Pulmonalarterie

LApCO₂ = Kohlendioxidpartialdruck linker Vorhof

Auch bei der CO₂-Eliminierung zeigen die Versuchslungen beider Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

PApCO ₂ -LApCO ₂ (mmHg)		
Messzeitpunkt	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	5,1 ± 2,3	8,4 ± 3,4
30 min	10,0 ± 11,4	8,3 ± 4,6
60 min	10,3 ± 3,8	10,7 ± 2,5
120 min	10,9 ± 1,8	9,1 ± 1,3
180 min	10,8 ± 1,3	9,0 ± 0,6
240 min	10,1 ± 1,6	7,9 ± 2,3
300 min	9,2 ± 1,8	7,6 ± 2,0
360 min	10,2 ± 2,1	8,3 ± 1,4

Tabelle 15: CO₂-Differenz Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.3.2.3 Atemhubvolumen und Beatmungsdruck

Analog zu Kapitel 3.2.2.3 werden die Werte der Atemhubvolumina und Beatmungsdrücke der beiden Gruppe 2 und 3 nicht einzeln aufgeführt, sondern auf die aussagekräftigere Compliance verwiesen.

3.3.2.4 Statische Compliance

$$\text{Statische Compliance} = \frac{AHV(ml)}{P_{\text{mean}}(mmHg)}$$

Bei der Compliance zeigen sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (p-Wert = 0.082).

Compliance (ml/mmHg)		
Messzeitpunkt	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	50,2 ± 5,3	50,9 ± 2,4
30 min	29,2 ± 5,9	24,7 ± 11,1
60 min	41,8 ± 9,9	46,3 ± 4,4
120 min	46,4 ± 6,4	45,4 ± 4,0
180 min	45,9 ± 5,1	44,4 ± 3,7
240 min	50,1 ± 3,7	44,7 ± 4,3
300 min	45,5 ± 3,4	45,2 ± 5,1
360 min	43,5 ± 6,9	45,0 ± 6,1

Tabelle 16: Compliance Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

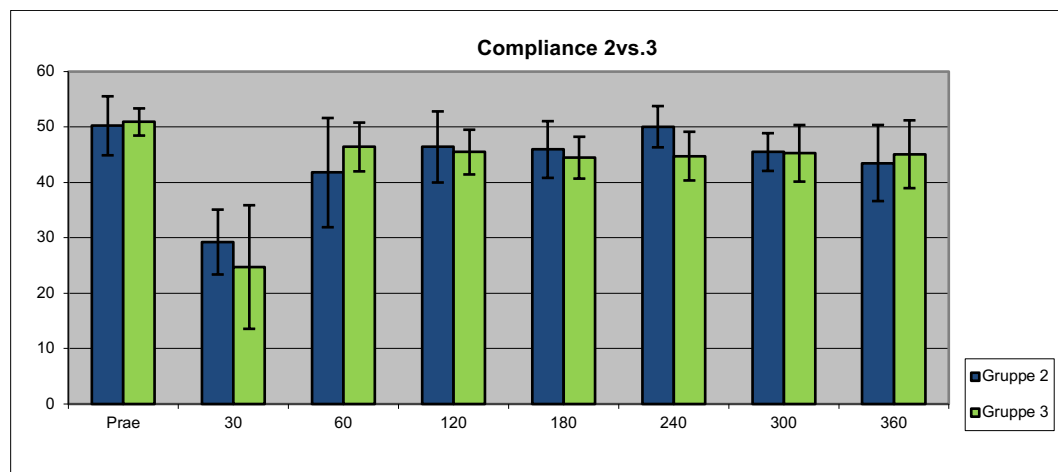


Abbildung 22: Compliance Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.3.3 Hämodynamische Parameter

3.3.3.1 PA- und LA-Druck

Der Druck im linken Vorhof (LA) ist sowohl bei der zellhaltigen als auch bei der zellfreien Perfusion über den gesamten Verlauf konstant. In beiden Gruppen wurde das geschlossene System mit Zentrifugalpumpe verwendet.

Dagegen verhält sich der Druck in der Pulmonalarterie (PA) unterschiedlich. Während der PA-Druck in Gruppe 2 über den Zeitverlauf langsam aber kontinuierlich ansteigt, um am Ende der Reperfusionzeit Werte um 25mmHg zu erreichen, bleibt er bei der zellfreien Perfusion (Gruppe 3) konstant und übersteigt im Mittel nie 14,5mmHg. Die Gruppe zeigt einen (von der Baseline-Messung unabhängigen), statistisch signifikanten Effekt auf den Pulmonalarteriendruck (p -Wert = 0.005).

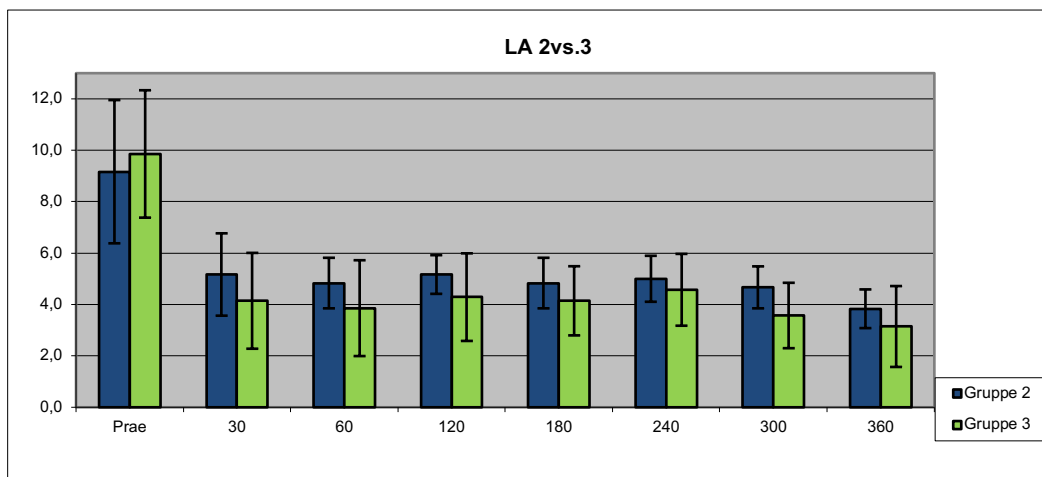


Abbildung 23: LA-Druck Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

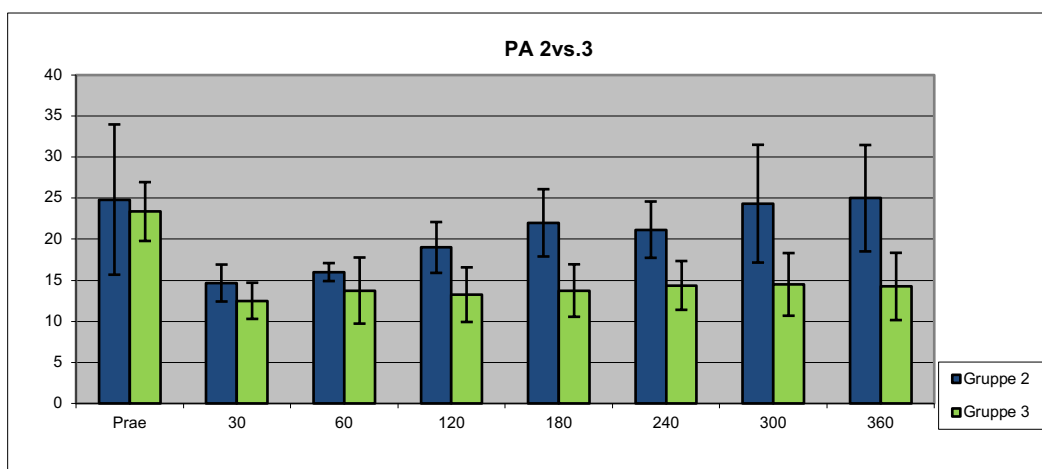


Abbildung 24: PA-Druck Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

Die Abbildungen 23 und 24 veranschaulichen diese Entwicklung eindrücklich.

3.3.3.2 Pulmonaler Gefäßwiderstand

$$PVR = \frac{PA - LA}{HZV} \times 79,8 \quad (\text{dyn} * \text{s} * \text{cm}^{-5})$$

Legende:

PVR = pulmonary vascular resistance

PA = pulmonalarterieller Druck

LA = linksatrialer Druck

HZV = Herzzeitvolumen

Entsprechend der niedrigeren PA-Werten ändert sich bei der zellfreien Perfusion auch der pulmonale Gefäßwiderstand. So wird in Gruppe 3 ein deutlich geringerer PVR gemessen. Im Vergleich zur Erythrozytengemisch-Perfusion werden nur halb so hohe Widerstände erreicht, vor allem bleiben sie über den Zeitverlauf konstant. Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0.01) zwischen der zellfreien und der zellhaltigen Perfusion.

Messzeitpunkt	PVR (dyn*s*cm ⁻⁵)	
	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	203,5 ± 81,7	125,8 ± 21,2
30 min	758,1 ± 206,5	627,0 ± 155,7
60 min	594,0 ± 97,6	486,4 ± 211,5
120 min	735,9 ± 148,2	456,0 ± 129,7
180 min	913,2 ± 213,9	478,8 ± 122,8
240 min	860,0 ± 148,2	486,4 ± 148,6
300 min	1046,2 ± 368,0	547,2 ± 180,9
360 min	1126,0 ± 379,7	570,0 ± 193,5

Tabelle 17: PVR Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

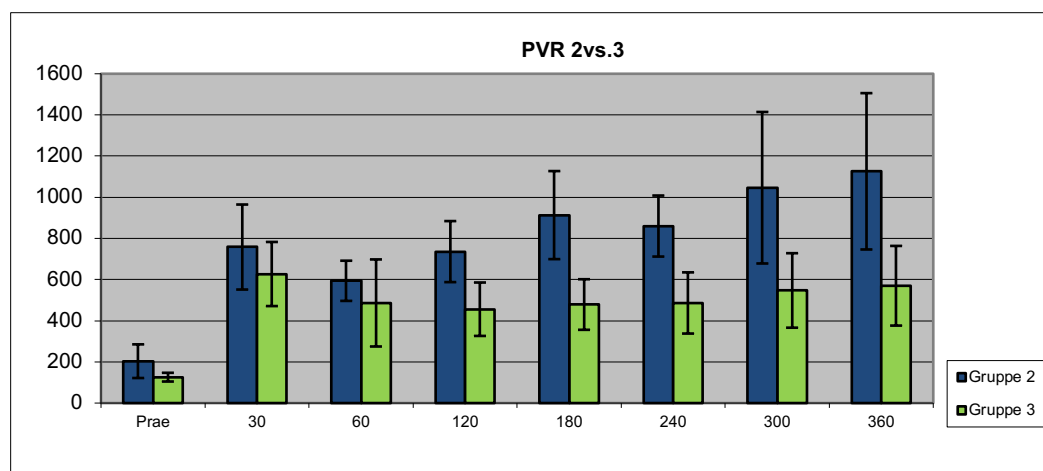


Abbildung 25: PVR Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.3.4 Intrapulmonaler Wassergehalt

3.3.4.1 PDI

Bei der makroskopischen Beurteilung der Versuchslungen mit Hilfe des PDI können wiederum keine entscheidenden Vorteile durch eine zellfreie Perfusion beobachtet werden. Die Werte sind zwar ab der zweiten Perfusionsstunde offensichtlich niedriger, jedoch fällt der Unterschied nicht signifikant aus ($p\text{-Wert} = 0.0706$).

In Gruppe 2 erfüllen von 6 Lungen zwei Organe nicht die Kriterien für eine Transplantation, während in Gruppe 3 entsprechend der PDI-Definition eine Lunge (von 8) nicht dafür geeignet ist.

PDI		
Messzeitpunkt	Gruppe 2	Gruppe 3
30 min	2,16 ± 0,25	2,21 ± 0,39
60 min	2,16 ± 0,25	1,78 ± 0,26
120 min	1,91 ± 0,58	1,14 ± 0,37
180 min	1,91 ± 0,58	1,28 ± 0,56
240 min	1,83 ± 0,51	1,35 ± 0,55
300 min	2,25 ± 0,52	1,57 ± 0,78
360 min	2,41 ± 0,58	1,42 ± 0,73

Tabelle 18: PDI Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

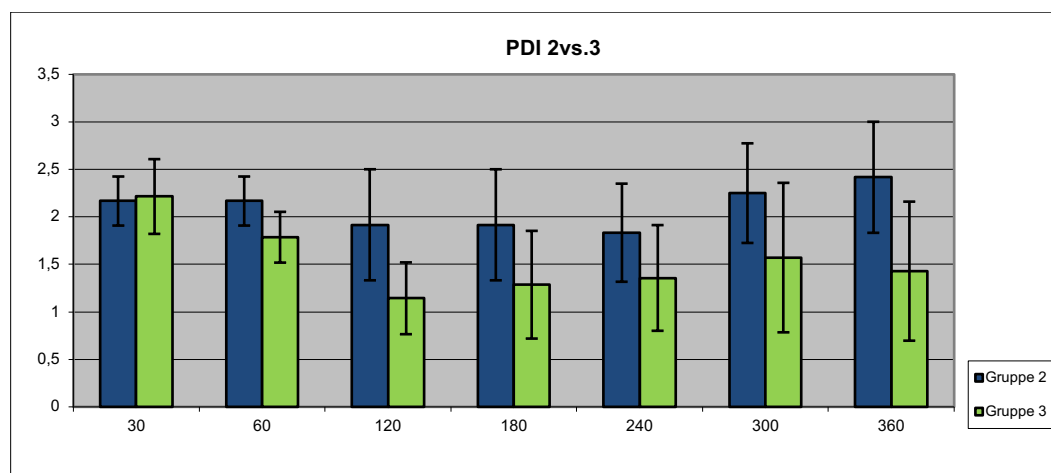


Abbildung 26: PDI Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.3.4.2 Wet-dry-ratio

Auch beim Wassergehalt des pulmonalen Parenchyms erreicht die zellfreie Perfusion keinen statistischen Vorteil. Während die Gesamt-wet-dry-ratio in Gruppe 2 einen Mittelwert von 4,8 +/- 0,37 aufweist, liegt sie bei der zellfreien Perfusion (Gruppe 3) bei 4,2 +/- 0,21. Der Unterschied ist nicht statistisch signifikant.

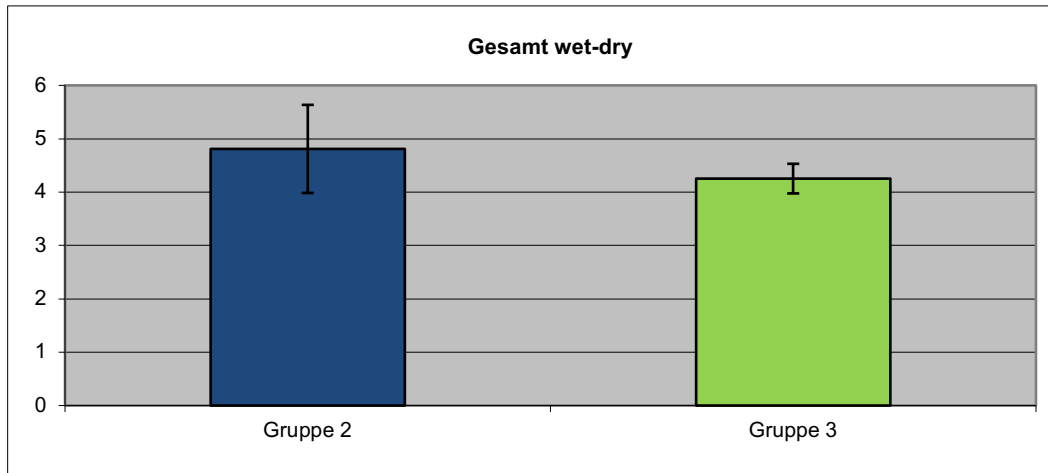


Abbildung 27: Gesamt-wet-dry-ratio Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

Auch bei Analyse der einzelnen Lungenlappen lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen feststellen (p-Wert = 0.528).

Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio		
Lappen	Gruppe 2	Gruppe 3
LOL	4,9 ± 1,0	4,4 ± 0,3
LML	4,7 ± 0,6	4,3 ± 0,1
LUL	4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,2
ROL	4,4 ± 0,8	3,9 ± 0,2
RML	5,2 ± 1,3	4,1 ± 0,1
RUL	4,6 ± 0,4	4,1 ± 0,4

Tabelle 19: Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio (Mittelwert und Standardabweichung)

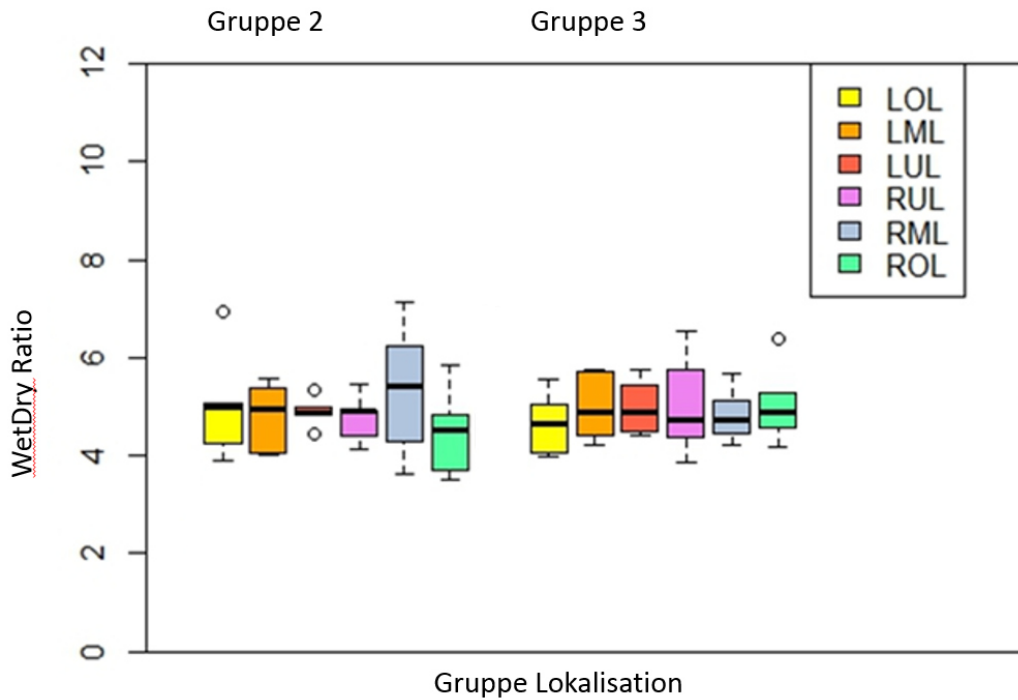


Abbildung 28: Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio (Mittelwert und Standardabweichung)
(LOL=linker Oberlappen, LML=linker Mittellappen, LUL=linker Unterlappen; ROL=rechter Oberlappen, RML=rechter Mittellappen, RUL=rechter Unterlappen)

3.3.5 Analyse der Gewebeproben

3.3.5.1 Histologie

Die histologische Auswertung mittels LIS (nach Rotta) ergibt ebenfalls keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen.

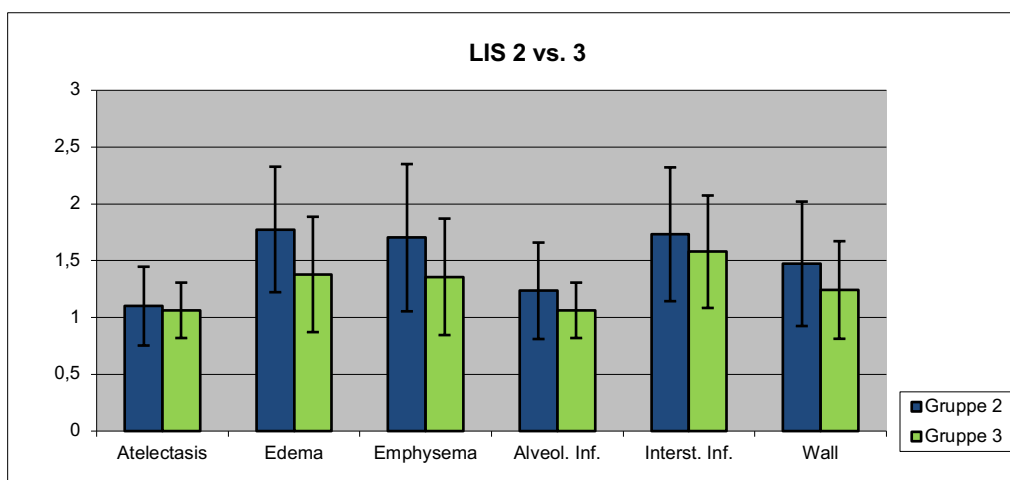


Abbildung 29: Lung Injury Score Gruppe 2 vs. 3 (Mittelwert und Standardabweichung)

3.3.5.2 MPO

Wenn man die Ergebnisse des MPO-Assays vergleicht, so stellt man fest, dass bezogen auf die Gesamtmenge der gemessenen Myeloperoxidase pro Lunge zwischen den Prae-Werten und den Werten der einzelnen Gruppen relevanten Unterschiede auszumachen sind (p-Wert = 0.007).

Auch der Vergleich zwischen Gruppe 2 und 3 nach 360min Perfusionsdauer zeigt einen signifikanten Unterschied (p-Wert = 0.013), d.h. in der zellfreien Perfusionsgruppe wird postum eine geringere MPO-Aktivität gemessen.

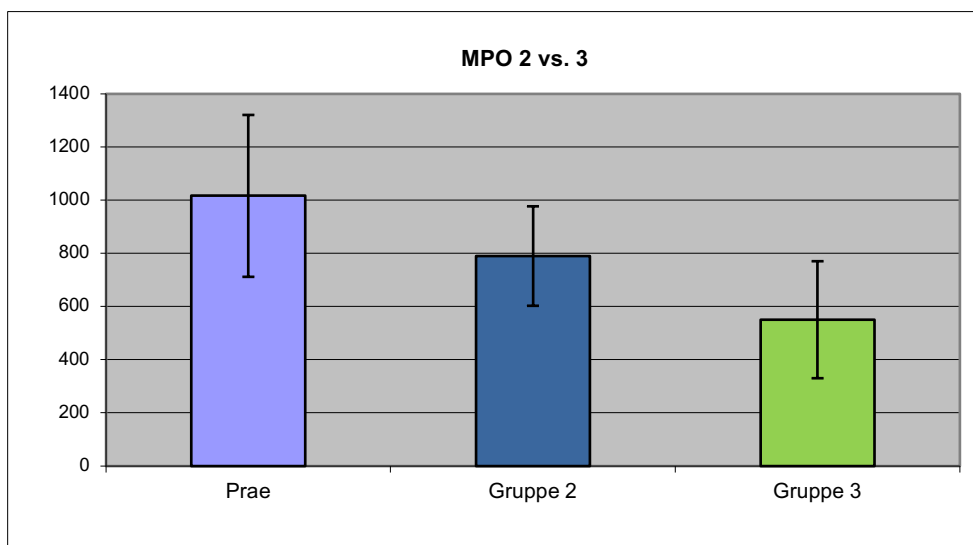


Abbildung 30: MPO gesamt Gruppe 2 vs. 3 in U/l (Mittelwert und Standardabweichung)

Bei Betrachtung der einzelnen Lungenlappen fällt auf, dass insbesondere der LOL, RML und RUL der zellfreien Perfusion eine geringere Aktivität im Vergleich zur zellhaltigen Perfusionsgruppe zeigen.

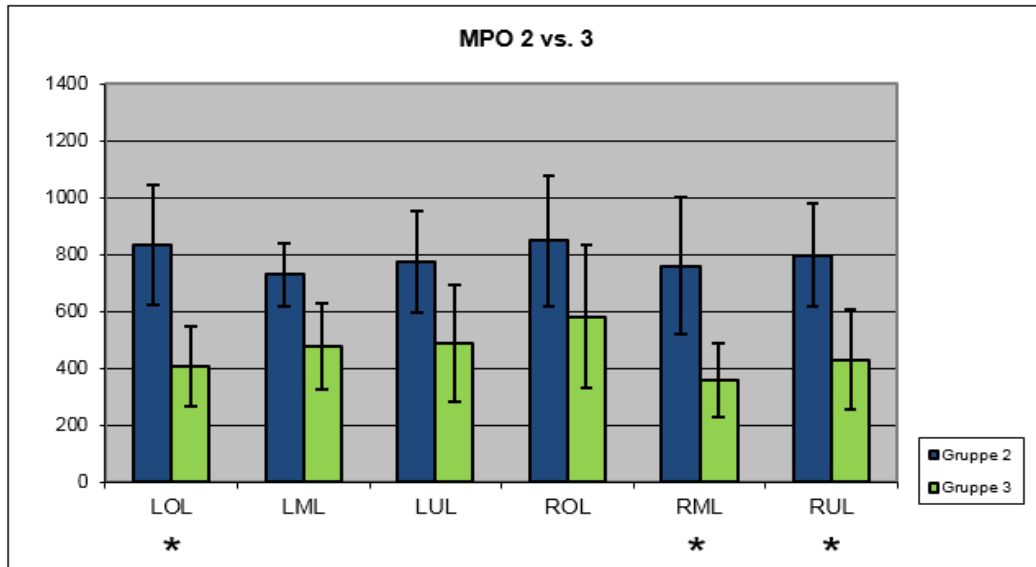


Abbildung 31: MPO lappenbezogen Gruppe 2 vs. 3 in U/l (Mittelwert und Standardabweichung)

(LOL=linker Oberlappen, LML=linker Mittellappen, LUL=linker Unterlappen; ROL=rechter Oberlappen, RML=rechter Mittellappen, RUL=rechter Unterlappen)

(„*“ entspricht $p < 0,05$)

3.4 Aspekte des Stoffwechsels

3.4.1 Elektrolytverschiebungen

Während der Versuchsdurchführung sind die Elektrolytverschiebungen im Perfusat in teilweise nicht-physiologische Bereiche auffällig. Zur Veranschaulichung sind im Folgenden die Werte für Natrium sowie Kalium aufgeführt. Zum besseren Verständnis sollte man wissen, dass die Normalwerte für Natrium zwischen 136-148mmol/L und für Kalium zwischen 3,6-5,2mmol/L im Blut eines Schweins liegen.

Gerade für Natrium werden in allen drei Gruppen übernormale Werte erreicht, am stärksten beim offenen System (Gruppe 1). Generell ist im Verlauf ein Anstieg der Werte während der Reperfusion zu beobachten. Bereits zu Beginn der Reperfusion liegen die Natriumwerte außerhalb des Normalbereiches. Eine mögliche Ursache könnte in der Gabe von Natriumbicarbonat zur Pufferung des pH-Wertes liegen.

Na ⁺ -Werte			
Messzeitpunkt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	139,0 ± 2,7	138,5 ± 2,4	140,9 ± 0,9
0 min	161,4 ± 4,2	154,7 ± 5,6	143,7 ± 1,5
30 min	158,9 ± 3,9	152,8 ± 4,3	151,3 ± 5,2
60 min	163,4 ± 2,9	159,0 ± 4,6	156,6 ± 2,4
120 min	166,2 ± 2,5	161,8 ± 4,5	160,4 ± 2,5
180 min	169,6 ± 3,4	164,0 ± 4,9	164,3 ± 1,8
240 min	173,5 ± 1,6	167,0 ± 4,0	168,6 ± 2,9
300 min	177,9 ± 2,3	169,0 ± 10,6	172,3 ± 3,6
360 min	180,0 ± 3,3	173,3 ± 8,4	174,3 ± 3,1

Tabelle 20: Na⁺-Werte (Mittelwert und Standardabweichung)

Die Kaliumwerte bewegen sich über den Verlauf dagegen in einem physiologischen Bereich. Ebenso verhält es sich mit den nicht dargestellten Calcium-, Magnesium- und Chlorid-Werten.

Bei der Auswertung der Kalium-Werte fällt aber ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen auf. Gruppe 1, d.h. das offene Reperfusionssystem, zeigt im Vergleich zum geschlossenen Systemkreislauf signifikant niedrigere Werte auf. Nachfolgend sind die Werte in Tabelle 21 aufgeführt.

K⁺-Werte			
Messzeitpunkt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	3,5 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,8 ± 0,4
0 min	2,1 ± 0,3	4,0 ± 0,4	4,7 ± 0,1
30 min	2,5 ± 0,3	3,9 ± 0,3	4,4 ± 0,2
60 min	2,6 ± 0,5	3,4 ± 0,3	4,0 ± 0,2
120 min	2,3 ± 0,2	3,0 ± 0,4	3,6 ± 0,3
180 min	2,3 ± 0,2	3,2 ± 0,5	3,7 ± 0,4
240 min	2,4 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,8 ± 0,3
300 min	2,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,9 ± 0,3
360 min	2,9 ± 0,2	3,5 ± 0,3	4,2 ± 0,3

Tabelle 21: K⁺-Werte (Mittelwert und Standardabweichung)

3.4.2 Laktatanstieg

Außerdem konnte in allen Versuchsgruppen ein Anstieg des Laktates beobachtet werden. In den Gruppen mit geschlossenem System (Gruppe 2 und 3) stieg das Laktat ab der ersten Stunde deutlicher als in der Kontrollgruppe mit offenem System an. Der Unterschied fällt signifikant aus (p-Wert = 0.0116).

Laktat-Werte			
Messzeitpunkt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Prae	2,2 ± 0,6	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,7
0 min	1,3 ± 1,4	0,5 ± 0,4	0,3 ± 0,1
30 min	2,3 ± 2,1	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,3
60 min	3,5 ± 2,5	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,9
120 min	5,7 ± 2,5	7,4 ± 1,2	7,2 ± 1,3
180 min	7,8 ± 2,3	10,1 ± 0,7	10,7 ± 2,4
240 min	9,4 ± 2,7	12,0 ± 1,2	13,5 ± 3,3
300 min	10,3 ± 2,6	13,7 ± 2,9	16,0 ± 4,6
360 min	11,0 ± 2,7	16,3 ± 1,7	17,9 ± 5,2

Tabelle 22: Laktatanstieg (Mittelwert und Standardabweichung)

4 Diskussion

Ein ex-vivo Lungenperfusionssystem zur Rekonditionierung von vorgeschädigten Lungen stellt einen weiteren Versuch dar, die geringe Zahl geeigneter Spenderorgane für Lungentransplantationen zu vergrößern. Dies ist eine von vielen zur Zeit diskutierten Strategien, um der immer größer werdenden Diskrepanz zwischen Angebot und Nachfrage entgegenwirken zu können.

Gerade die Lunge reagiert besonders sensibel auf Hirntod (Cypel et al. 2011), der in Deutschland und auch in vielen anderen Ländern Voraussetzung für eine Organspende ist. Neurogenes Lungenödem ist ein üblicher Schaden bei einem hirntoten Patienten. Auch wenn die Mechanismen noch nicht eindeutig verstanden sind, so vermutet man den plötzlichen und heftigen Anstieg des Gefäßwiderstandes bedingt durch den sogenannten „Katecholamin-sturm“ als Ursache. Dies führt zu hämodynamischen Veränderungen und letztendlich über Endothelschäden zur Ausbildung von Ödemen (Novitzky et al. 1987). Aber auch systemische Infektionen nach Hirntod können zu Endothel- und Epithelschäden führen (Cypel et al. 2011). Circa 75-80% aller verfügbaren Lungen sind für eine Transplantation ungeeignet aufgrund von Schäden durch Traumata, Lungenödem oder Aspiration (Egan et al. 1992). Somit erscheint die Thematik dieser Arbeit vor dem Hintergrund einer Ausweitung der Spenderkriterien zunehmend interessant.

4.1 Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll

Für eine suffiziente Rekonditionierung von vorgeschädigten Lungen bedarf es einer Reihe von Elementen, die in ihrer Summe den Erfolg ausmachen.

Als Vorbereitung zur erfolgreichen Rekonditionierung einer Lunge trägt die ante- und retrograde Perfadex-Perfusion vor und nach der Explantation des Organs bei. Dieses Verfahren ist zur Zeit Standard in der klinischen Praxis bei Lungensexplantation. Perfadex ist ein kolloidosmotische, kaliumarme Lösung, die speziell für Lungentransplantation entwickelt wurde und nachweislich den Ischämie-Reperfusionsschaden reduzieren kann (de Perrot et al. 2003). Die Lungengefäße werden dabei nahezu zellfrei gespült. Die Arbeitsgruppe von Wittwer bestätigt dies und hebt die Effektivität der zusätzlichen retrograden Perfusion hervor (Wittwer et al. 2004, 2005). Auch andere Arbeiten berichten über eine bessere Verteilung der Spüllösung durch die retrograde Perfusion, zusätzlich können eventuelle Mikrothromben so entfernt werden (Strüber et al. 2002, Varela et al. 1997). Neben diesen Effekten erreicht man durch die 4°C kalte Spülung auch eine Reduzierung des Metabolismus um das 12- bis 13-fache und verlängert so die Ischämietoleranz (van Raemdonck et al. 2018).

Ein weiteres Kernelement stellt das standardisierte Protokoll dar, mit dem das hypotherme Organ vorsichtig auf physiologische Temperatur gebracht wird. Letztendlich haben sich weltweit drei ex-vivo Lungenperfusions-Protokolle etabliert, die sich in wenigen Punkten unterscheiden. Hierzu zählen das Lund-Protokoll (Schweden), das Toronto-Protokoll und das Organ Care System (OCS) der Hannover und Madrid-Gruppe (Sanchez et al. 2016, van Raemdonck 2015). Alle betonen als entscheidende Elemente eine langsame und kontrollierte Reperfusionphase, eine kontrollierte Beatmung mit niedrigem PEEP und Tidalvolumen sowie die Verwendung von einer extracellulären, Dextran-40-basierten Perfusionslösung (van Raemdonck et al. 2015). Alle drei Gruppen sind bereits in klinischer Erprobung mit ihren Settings.

Der kontrollierte Beginn der Reperfusion mit einer langsamen und schrittweisen Steigerung der Temperatur und des Blutflusses ist zur Schonung des Lungengewebes von besonderer Bedeutung. Im hypothermen Zustand ist das Gewebe sehr anfällig und es droht der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden, der sich klinisch als primäres Transplantatversagen (primary graft dysfunction) manifestieren kann. Er ist der führende Risikofaktor für frühe Morbidität und Mortalität nach Lungentransplantation (Lee et al. 2009). Das klinische Spektrum des Ischämie-Reperfusionsschaden reicht von einer leichten akuten Lungenschädigung (acute lung injury) bis hin zum akuten Lungenversagen (ARDS) und äußert sich durch eine Hypoxämie, erhöhten PVR, niedrige Compliance sowie Lungenödem (Mühlfeld et al. 2007).

Einerseits führen die Ischämiezeit selbst und andererseits die nicht physiologische Oberfläche des Reperfusionssystems konsekutiv zum Gewebeschaden in der Lunge. Apoptose, Nekrose und alveolares Lungenödem sind die morphologischen Folgen, die dadurch entstehen können und zu gesteigerter Kapillarpermeabilität und reduzierter Lungenfunktion führen (van Putte 2005). Fischer und seine Kollegen waren die ersten, die über Apoptose – ein von einer Zelle selbst ausgelöster, programmierter Zelltod - nach Lungentransplantation als Folge des Ischämie-Reperfusionsschaden während der frühen Reperfusionphase berichteten (Fischer et al. 2000).

Daher ist es also entscheidend, die Reperfusion langsam und kontrolliert bei 21°C und minimalem Fluss zu starten und im Verlauf erst schrittweise zu erhöhen. Bei 37°C sollte eine Flussgeschwindigkeit von 1500ml/min erreicht sein und für die restliche Perfusionszeit beibehalten werden. Dies entspricht etwa 40% des normalen Herzzeitvolumens. Auch die Toronto-Gruppe strebt diesen Zielfluss an (Cypel et al. 2009). Andere Gruppen dagegen berichten über einen Flow zwischen 40-100% (van Raemdonck et al. 2015). Konsens besteht

diesbezüglich, dass der pulmonalarterielle Mitteldruck (PAP) nicht über 20mmHg betragen sollte, um protektiv in Hinblick auf eine hydrostatische Ödembildung zu sein.

Der Blutfluss ist dabei in unserem Modell unphysiologischer Weise nicht-pulsatil, d.h. also kontinuierlich. Schumer und Kollegen haben gerade diese Fragestellung gezielt an einem Schweine-Tiermodell untersucht und keinen signifikanten Unterschied zwischen pulsatilem und nicht-pulsatilem Fluss im Rahmen einer EVLP feststellen können (Schumer et al. 2015). Aber auch hier werden in der Literatur unterschiedliche Auffassungen beschrieben.

Auch Steen et al. (Lund, Schweden) berichtet bereits früh, dass bei kalt konservierten Spenderlungen eine langsame Erhöhung der Flussgeschwindigkeit und Temperatur zur Vermeidung eines Ischämie-Reperfusion-Schadens wichtig ist (Steen et al. 2003). Steen und Kollegen haben vor allem mit der Entwicklung der auch von uns verwendeten „Steen-Solution“ einen besonderen Beitrag zur ex-vivo Evaluierung von Lungen geleistet. Die hochosmolare Perfusionslösung mit zusätzlichen Radikalfängern und zytoprotektiven Faktoren ist aufgrund des hohen kolloidosmotischen Druckes zur Ödemvorbeugung geeignet (Steen 2001). Ursprünglich zur Evaluierung von Spenderlungen von „non-heart-beating donors“ entwickelte er und sein Team einen Reperfusionskreislauf, um die Spenderlungen für 60-90min zu beobachten, bevor sie zur eventuellen Transplantation freigegeben werden.

Auch andere Gruppen arbeiteten daraufhin an ähnlichen Modellen zur Rekonditionierung von Spenderlungen (Rega et al. 2003, Egan et al. 2006, Neyrinck et al. 2006, Wierup et al. 2006). Erasmus und Kollegen führten Versuche mit verlängerter Perfusionsdauer von 6h durch. Dabei beobachtete er bei konstant bleibendem Gasaustausch gegen Ende der Perfusionszeit einen Anstieg des PVR sowie der Beatmungsdrücke (Erasmus et al. 2006).

Cypel et al. (2008) zeigte eindrücklich, dass eine ex-vivo Lungenperfusion sogar über 12h aufrechterhalten werden kann und das bei stabilen PVR, Beatmungsdruck, Oxygenierungskapazität und ohne Ödembildung. Dies erfolgte mit azellulärer Perfusionslösung in einem geschlossenen System bei 40% des initialen HZV sowie mit stabilem positiven LA-Druck (5mmHg) und protektivem Beatmungsregime (Frequenz 7/min, PEEP=5mmHg, Hubvolumen 7ml/kg). Cypel und Kollegen betonen die Wichtigkeit der kontrollierten Reperfusion und Beatmung, um endotheliale und epitheliale Lungenschäden mit konsekutivem Lungenödem zu minimieren (Cypel et al. 2009). Auch van Raemdonck sieht in seinem Review-Artikel hierin einen entscheidenden Schlüssel zum Erfolg (van Raemdonck et al. 2015).

Das Beatmungsregime trägt ebenso einen Anteil am Erfolg einer Rekonditionierung. Es ist bekannt, dass eine Beatmung mit hohen Drücken und ohne PEEP nachteiliger ist als eine

sogenannte „low-pressure“ Beatmung mit PEEP-Unterstützung, da letztere eine geringere Dysregulation der Balance der inflammatorischen Mediatoren hervorruft (Cobelens et al. 2009). In unseren Modellen wurde daher zur Vermeidung von Atelektasen mit einem PEEP zwischen 7-10mmHg und einem mittleren Beatmungsdruck von max. 15mmHg gearbeitet. Bei Betrachtung der Compliance-Werte in situ und während der Perfusion sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. In der Literatur werden hier PEEP-Werte von 5-7cmH₂O empfohlen, auch das Tidalvolumen wird mit Werten zwischen 5-7ml/kg Körpergewicht angegeben (van Raemdock et al. 2015, Sanchez et al. 2016).

Darüber hinaus ist eine von uns auch praktizierte Steroidapplikation empfehlenswert, einerseits zur Minderung des Ischämie-Reperfusionsschaden, andererseits um die inflammatorische Reaktion auf das fremde Material zu unterdrücken (Wan et al. 1997). Wan berichtet auch über eine geringere Vasokonstriktion und damit verbesserte Perfusion des Organs. In unserem Protokoll ist die Gabe von 500g Methylprednisolon in situ, zu Reperfusionbeginn und nach 3h Reperfusion angesetzt.

Leukozyten haben ebenfalls großen Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionsschaden (Welbourn et al. 1991). Daher ist in unserem Perfusionskreislauf ein Leukozytenfilter zwischengeschaltet. Leukozyten sind bekannt dafür, Gewebeschäden unterschiedlichen Ausmaßes zu generieren (van Putte 2005). Fiser et al berichteten 2001 diesbezüglich von einem zweiphasischen Verlauf. Einer frühen Schädigungs-Phase durch Makrophagen folgt eine späte Phase, die auf aktivierte neutrophile Granulozyten und Lymphozyten zurückzuführen ist (de Perrot et al. 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Luc et al. wird der Einsatz der Leukozytenfilter vor dem Hintergrund einer möglichen Sättigung des Filters bei längerer Anwendungsdauer jedoch wiederum in Frage gestellt (Luc et al. 2017). Bei 12h EVLP im Schweinetiermodell wurden mit und ohne Filter erhöhte Werte an Leukozyten und proinflammatorischen Cytokinen (TNF, IL-6) im Perfusat bei vergleichbaren physiologischen Lungenparametern festgestellt.

Auch die Verwendung von Erythrozytenkonzentrat in Kombination mit der Steen-Solution anstelle von Vollblut reduziert die Fülle der inflammatorischen Zellen. Gerade über die Zusammensetzung der Perfusionslösung, d.h. ob azellulär oder zellulär perfundiert werden soll, wird reichlich diskutiert. Während die Toronto-Gruppe Vorteile in einer zellfreien Perfusion sieht, werden nach Lund- bzw. OCS-Protokoll Erythrozyten zur Perfusionslösung hinzugegeben (Andreasson et al. 2014).

Der anfängliche Einsatz der neuen Trichterkanülen der Firma Vitrolife konnte uns während der Versuchsphase wenig überzeugen, sodass wir nach drei Versuchen wieder zur alten

Technik mit gesamtem Herz-Lungen-Block übergegangen sind. Die Toronto-Gruppe dagegen ist vom Einsatz dieser Kanüle überzeugt, da sie ihrer Ansicht nach durch einen physiologischen LA-Druck zwischen 3-5mmHg positive Effekte bzgl. Ödembildung bringt. Der LA-Druck wird hier über die Höhenverstellung des Reservoirs gesteuert. Linacre et al. berichtet diesbezüglich von einem eindeutigen Vorteil gegenüber der offenen Vorhof-Technik (Linacre et al. 2016). Aber auch hier sind unterschiedliche Auffassungen bei den etablierten Studienprotokollen vertreten. Das Lund- und OCS-Protokoll läßt den linken Vorhof offen. In unserem Setting wurden LA-Werte zw. 1-6mmHg gemessen, mit eindeutig niedrigeren Werten in Gruppe 1, also dem offenen Perfusionskreislauf.

4.2 Vergleich der Reperfusionssysteme

Zusammenfassend ergaben unsere Untersuchungen entgegen unseren Erwartungen und den Erfahrungen aus dem klinischen Alltag einen Vorteil bei Verwendung des offenen Reperfusionskreislaufs in Kombination mit einer Rollerpumpe. Für ein solches Set-up sprachen zum einen die Messwerte als auch die Handhabung des Systems insgesamt.

Basierend auf den bereits vorliegenden Erfahrungen und Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe mit dem offenen ex-vivo-Perfusionskreislauf lag nun der Fokus auf der Optimierung des Systems (Wipper et al. 2007, Wipper et al. 2008). Da bei der Therapie der durch Aspiration vorgeschädigten Lungen nur noch bedingt Fortschritte erzielt werden konnten, war nun Arbeitshypothese und damit erstes Ziel dieser Promotionsarbeit die bisherigen Ergebnisse durch eine Veränderung der mechanischen Systemkomponenten nochmals verbessern zu können.

Aus klinischer Erfahrung und Studien lag es daher nahe, den offenen Systemkreislauf durch einen geschlossenen Kreislauf zu ersetzen. Neben finanziellen Aspekten durch eine Reduzierung des Primingvolumens versprachen wir uns vor allem aber eine Verbesserung der Ergebnisse durch die Verringerung des Kontaktes von Blut mit Fremdoberfläche sowie durch Minimierung des Blutluftkontaktes. Ebenso wurde der Antrieb des Systems von einer Rollerpumpe auf eine Zentrifugalpumpe umgestellt.

Mehrere randomisierte klinische Studien zeigen einen Vorteil beim klinischen Outcome bei Verwendung eines geschlossenen Systems in Kombination mit einer Zentrifugalpumpe auf (Murphy et al. 2009). So wird eine geringe Complementaktivierung und Freisetzung von Polymorpho-nuclear-(PMN)-Elastase beobachtet (Jensen 2003). Complement-3a, Thromboxane, Fibrinspaltprodukte und Elastase sind signifikant höher in offenen CPB-Systemen (Schönberger 1995). Lindholm et al. bestätigten 2004 mit ihrer Studie diese

Beobachtungen. Außerdem berichten viele Autoren über eine reduzierte Hämolyse neigung bei Verwendung einer Zentrifugalpumpe (Moen 1994). Zwei Jahre später berichtet Moen et al. (1996), dass vor allem die Verwendung eines „heparin-coated“ System Vorteile hinsichtlich einer geringeren Komplementaktivierung sowie geringeren Aktivierung von Granulozyten und Thrombozyten bringt. Bei uns wurden in beiden System-Setups Heparin-beschichtete Schläuche und Komponenten verwendet.

Murphy schreibt in seinem Review-Artikel zum Thema optimale Perfusion bei kardiopulmonalem Bypass, dass die Mehrzahl der randomisierten klinischen Studien einen Vorteil zugunsten von Systemen mit Zentrifugalpumpe belegen (Murphy et al. 2009). Jedoch werden bei diesen Studien auch andere Variablen wie Primingvolumen, Oberflächenbeschaffenheit des Systems oder reduzierter Blut-Luft-Kontakt miteinbezogen und dies kann auch das klinische Outcome beeinflussen (Lindholm 2004, Moen 1996, Driessen 1991). Die „Guidelines by the Society of Thoracic Surgeons and the Society of Cardiovascular Anesthesiologist“ von 2007 empfehlen ebenfalls den Einsatz einer Zentrifugalpumpe, jedoch primär aus Sicherheitsgründen (Ferraris 2007).

Mit diesen Veränderungen erhofften wir uns vor allem, die Entwicklung des pulmonalvaskulären Widerstandes (PVR) über den Zeitverlauf positiv beeinflussen zu können. Der PVR ist ein verlässlicher Messparameter zur Detektierung von Endothelschädigung und mikrovaskulären Obstruktionen (Rega et al. 2003). Bei Betrachtung des PVR in der Kontrollgruppe (Gruppe 1), d.h. im offenen System mit Reservoir und Rollerpumpe konnte bereits ab der ersten Stunde nach Reperfusionbeginn ein Anstieg des PVR im Vergleich zu den in-vivo-Werten beobachtet werden. Ausgehend von in-vivo-Werten um die $200 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ im offenen und geschlossenen System lag die Problematik darin, dass die Werte (Mittelwerte) nach Reperfusionbeginn auf über $1231 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ in der Gruppe mit dem offenen Kreislaufsystem stiegen. Der Umstieg auf ein geschlossenes System zeigt zwar innerhalb der ersten Perfusionstunde eine deutliche Verbesserung auf Werte unter $758 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$, jedoch konnte dies nicht über den Zeitverlauf beibehalten werden, so dass der PVR in beiden Systemvarianten am Ende der sechsstündigen Perfusionsphase im Mittel deutlich über $1100 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ lag. Die Umstellung der Systemkomponenten ergab somit leider nicht den gewünschten Effekt der Reduzierung des pulmonalvaskulären Widerstandes.

Erasmus und Kollegen perfundierten ebenso wie wir Schweinelungen über einen Zeitraum von 6h (Erasmus et al. 2006). Dabei blieb der Gasaustausch konstant, jedoch berichteten auch sie über einen Anstieg des PVR und des Beatmungsdruckes. Im Unterschied zu unserem Modellversuch orientierten sie sich am PA-Druck. Durch Regulierung der Fluss-

geschwindigkeit sollte der Pulmonalarteriendruck (PA-Druck) nicht über 20mmHg steigen. Andere Gruppen versuchten den PA-Druck ebenfalls unter 20mmHg zu halten, um weiteren Schaden bzw. eine Ödembildung zu verhindern (Steen et al. 2003, Pego-Fernandes et al. 2010). In diesem Punkt unterscheidet sich unser Protokoll von dem anderer Gruppen, da wir bei konstanter Flussgeschwindigkeit (1,5L/min) durch andere Maßnahmen versuchen den PA-Druck konstant niedrig zu halten.

In hämodynamischen Aspekten (PA-Druck, PVR) konnten wir in unserem Modell keine Fortschritte erzielen. Ähnlich verhält sich dies auch mit den respiratorischen Parametern. Beim Gasaustausch (POC) und der Compliance konnten keine weiteren positiven Effekte ausgemacht werden. Lediglich die Auswertung des PDI wies auf einen Vorteil des offenen Reperfusionskreislaufes hin. So konnten in der Kontrollgruppe (Gruppe 1) alle 7 Lungen als transplantabel bewertet werden. Im geschlossenen System (Gruppe 2) dagegen lag der Durchschnitts-PDI eine Einheit unter der des offenen Systems. Zwei Lungen wurden sogar als ungeeignet zur Transplantation eingestuft, da sie deutliche Ödeme in mehreren Lappen sowie Atelektasen aufwiesen.

Auch die Histologie (lung injury score) sowie die Auswertung der MPO-Analyse zur Detektierung von Leukozytenaktivität konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen aufzeigen. Die wet-dry-ratio als Indikator für Ödembildung dagegen zeigte einen signifikanten Vorteil bei Verwendung des offenen Systems in Verbindung mit Rollerpumpe. Diese Tendenz korreliert auch mit den Beobachtungen beim PDI.

Zusammenfassend korrelieren unsere Ergebnisse nicht mit den klinischen Erfahrungen, die mit geschlossenen Perfusionssystemen erlangt wurden. Auch der Einsatz der Rollerpumpe zeigt sich im Nachhinein in unserem Modell als die bessere Variante zur Zentrifugalpumpe. Ähnliche Beobachtungen finden sich auch in der Literatur, z.B. berichtet Nishida et al. (1999), dass ein geschlossenes System hinsichtlich der Biokompatibilität zwar nützlich sei, jedoch der Unterschied zwischen offenen und geschlossenem System unerwartet klein ist.

Der Vorteil einer geringeren Hämolyse neigung bei Verwendung einer Zentrifugalpumpe wurde in unserem Modellversuch nicht genauer verfolgt, da keine Analysen zur Hämolyse der roten Blutzellen durchgeführt wurden.

Letztendlich wurde auch eine Reduzierung der Kosten durch einen Wechsel auf das geschlossene Perfusionssystem angestrebt. Bei beiden Kreislaufsystemen wurden pädiatrische Systeme verwendet, dabei erwies sich das Rollerpumpensystem günstiger in der Anschaffung. Vor allem das geringere Priming-Volumen des geschlossenen Kreislaufs war ein starkes

Argument für einen Wechsel, denn während letzteres mit 1000ml Steen-Lösung zu befüllen ist, benötigte das offene System mindestens doppelt so viel. In nachfolgenden Studiengruppen wurde jedoch aufgrund unserer Beobachtungen auf das offene Rollerpumpensystem zurückgegriffen. Gerade in der frühen Reperfusionphase zeigte sich das offene System einfacher in der Handhabung. Die Volumenschwankungen in den ersten 60min, während die Lunge sich vollständig entfaltet, waren mit einem Reservoirbeutel des geschlossenen Systems teilweise nur unbefriedigend auszugleichen.

Unser ex-vivo-Modell scheint dennoch vielversprechend in der Lage zu sein, Spenderlungen über einen Zeitraum von 6h effizient versorgen zu können, ohne dass die Qualität des Organs negativ beeinflusst wird. Die Kombination eines offenen Systems mit Rollerpumpe unter Verwendung von Leukozytenfilter und eines Steen-Blut-Gemisches stellte sich in unserer Arbeitsgruppe im Vergleich zum geschlossenen System mit Zentrifugalpumpe, aber ansonsten gleichem Setup, als die zu favorisierende Variante dar. Ein weiterer Optimierungsansatz könnte jedoch die Benutzung eines offenen Kreislaufes mit Reservoir in Kombination mit einer Zentrifugalpumpe darstellen.

4.3 Diskussion der zellfreien und zellreichen Organperfusion

Die Umstellung der mechanischen Komponenten stellte keine zufriedenstellende Optimierung unseres Reperfusionskreislaufes in Bezug auf die respiratorischen und hämodynamischen Untersuchungsparameter dar. Auf der Suche nach anderen Ansätzen entstand die Überlegung einer zellfreien Perfusion der Lungen. In unserer Studie kamen wir zu dem Ergebnis, dass eine azelluläre Perfusion durchaus möglich ist und eine Verbesserung des PVR hervorruft.

Die zellulären Bestandteile bewirken auf unterschiedlichen Wegen eine Aktivierung von Reaktionsmechanismen, die letztendlich in einer Schädigung der Lunge enden können. Wie bereits berichtet, spielen Leukozyten eine besondere Rolle beim Ischämie-Reperfusion-Schaden, daher ist der Einsatz eines Leukozytenfilters wichtig.

Darüber hinaus wird aber auch kontrovers diskutiert, inwieweit bei einem solchen Reperfuptionsmodell die Anwesenheit von Erythrozyten notwendig ist. Während die Kollegen aus Toronto eine zellfreie Perfusion präferieren, werden nach dem Lund- und auch OCS-Protokoll Erythrozyten bis zu einem Hämatokrit von 15-25% zur Perfusionlösung hinzugegeben. Erythrozyten sagt man aufgrund ihrer Sauerstofftransportkapazität und Pufferfunktion einen eher protektiven Charakter nach. Die entscheidende Frage bestand darin, ob die Steen-Lösung ausreichend ist, um eine Lunge optimal versorgen zu können. Bekanntermaßen findet der größte Teil des Sauerstofftransportes chemisch gebunden an

Hämoglobin in den Erythrozyten statt und nur ein geringer Teil ist physikalisch gelöst. Da bei einer zellfreien, also einer reinen Steen-Perfusion so gut wie keine Zellen vorhanden sind, kann der Sauerstofftransport nur physikalisch erfolgen. Als Gegenargument wird die Meinung vertreten, dass die Sauerstoffversorgung der Lungenzellen durch den Sauerstofftransport über die mechanische Beatmung ausreichend ist (Cypel et al. 2008). Die Beimengung von Erythrozyten kann durch den mechanischen Stress, der während der Perfusion auf die Zellen wirkt problematisch sein (Lee et al. 2007, Watanabe et al. 2007). Aufgrund der Annahme, dass eine Hämolyse von Erythrozyten zusätzlich einen negativen Effekt auf die Lunge hat, wuchs die Idee der zellfreien Perfusion der Versuchslungen.

Zunächst erfolgten bei uns zwei Vorversuche, bei denen die Lungen nur mit Steen-Lösung perfundiert wurden. Bis auf den Verzicht Eigenblut des Versuchstieres zuzugeben, blieb das Procedere das Gleiche, wie bereits oben beschrieben. Nach sechs Stunden kontinuierlicher Datenerhebung wurden die beiden Lungen zur Probengewinnung seziiert.

Basierend auf ersten positiven Messwerten und positiven makroskopischen Eindrücken wurde daraufhin eine Gruppe bestehend aus weiteren 6 Versuchstieren (Gruppe 3) aufgestellt. Die Versuche wurden nach bereits beschriebenem Protokoll durchgeführt. Verwendet wurde dabei das geschlossene System in Kombination mit Zentrifugalpumpe.

Zusammenfassend lässt sich berichten, dass in der zellhaltigen Gruppe (Gruppe 2) zwei der 6 Versuchslungen die Transplantabilitätskriterien nicht erfüllt haben. In der Gruppe der zellfreien Perfusion (Gruppe 3) wurde eine als ungeeignet eingestuft.

Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied beim PVR zugunsten der zellfreien Perfusion (Gruppe 3) beobachtet werden. Der pulmonalvaskuläre Widerstand war im Vergleich zur zellhaltigen Gruppe (2) nach 360min mit $570 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ nur halb so hoch. Dabei war auch gut zu erkennen, dass der PVR über den Zeitverlauf nicht anstieg. Entsprechend dem PVR verhielt sich auch der PA-Druck, der im Mittel die 14,5mmHg nicht überstieg, während der PA-Druck in Gruppe 2 (Blut-Steen) gegen Ende der Reperfusion Werte um 25mmHg erreichte.

Bei Betrachtung der übrigen respiratorischen und hämodynamischen Parameter konnten wir dagegen keine signifikanten Vorteile oder Nachteile der zellfreien Perfusion erkennen. Gasaustausch, Compliance, wet-dry-ratio, die Auswertung der histologischen Proben sowie der MPO-Analyse zeigten keine relevanten Unterschiede.

Die Toronto-Gruppe berichtete erstmals im Jahr 2008 von einem ex-vivo Lungen-reperfusionskreislauf, bei dem auch azelluläre Steen-Lösung benutzt wurde (Cypel et al. 2008). Lediglich Heparin, Cefazolim und Mehtylprednisolon wurden zum Kreislauf dazugegeben.

Verwendet wurde dabei ein offenes System mit Reservoir und Zentrifugalpumpe, mit dem die Spenderlungen über einen Zeitraum von 12h perfundiert und ventiliert wurden. Anschließend wurden die Schweinelungen transplantiert und für weitere 4h beobachtet. Cypel et al. konnte dabei ähnliche Werte für den PA-Druck und somit den PVR messen wie wir.

Darüber hinaus berichtete er, dass die Zugabe von Erythrozyten in einem anderen Versuchsmodell mit abgelehnten menschlichen Spenderlungen keinen signifikanten Benefit zugunsten einer besseren Oxygenierung gebracht habe (Cypel 2008). Im Jahr 2011 berichteten Cypel et al. als erste von einer klinischen Anwendung (HELP trial) der EVLP. Es wurden gleichwertige Ergebnisse im Vergleich zu Standard-Spenderlungen nach Transplantation von „high-risk“-Spenderlungen erreicht, die zuvor mittels EVLP azellulär über 4h reconditioniert wurden.

Bei azellulärer Perfusionslösung haben Yeung und Kollegen herausgefunden, dass ein Abfall der Compliance als frühester Marker für die abnehmende Lungenqualität anzusehen ist, lange bevor andere Parameter wie der PaO₂ auffällig werden (Yeung et al. 2012).

Auch Roman et al. und Becker et al. haben interessante Daten zu diesem Thema veröffentlicht (Roman et al. 2015, Becker et al. 2016). In Schweine-Tiermodellen untersuchten sie die Auswirkungen von azellulärer versus zellulärer Perfusionslösung auf die Spenderorgane. Beide Forschergruppen berichten von gleichwertigen Ergebnissen in beiden Untersuchungsgruppen nach 4 bzw. 12 Stunden EVLP. Becker konnte hierbei auch einen niedrigeren PVR in der zellfreien Perfusionsgruppe feststellen. Auch Nilsson und Kollegen berichten über gleichwertige Lungenfunktionen sowie histopathologische Veränderungen, aber auch über einen Compliance-Abfall sowie Zunahme eines Lungenödems unter azellulärer Perfusionslösung (Nilsson et al. 2017).

Eine Perfusion der Spenderlungen mit azellulärer Steen-Lösung in einem geschlossenen Kreislauf ist über einen Zeitraum von 6h eindeutig realisierbar. Bis auf eine Reduzierung des PA-Druckes und damit einer Verbesserung des pulmonalvaskulären Widerstandes konnten wir in unserem Versuchsmodell jedoch keine Verbesserung gegenüber der zellhaltigen Perfusion feststellen. Die anfänglichen Bedenken über das Fehlen von Erythrozyten und der damit fehlenden Sauerstofftransportfunktion waren demnach nicht begründet.

4.4 Diskussion der Stoffwechsellage

Im Verlauf der Versuche stellte sich zudem ein weiteres Problem heraus. Die Elektrolytwerte verschoben sich teilweise in deutlich unphysiologische Bereiche und es konnte ein nicht unerheblicher Anstieg des Laktatpiegels beobachtet werden. Letzterer stellte sich beim

Vergleich in den Gruppen mit geschlossenem System deutlicher dar als in der Kontrollgruppe. Ein hierfür möglicher Grund mag am geringeren Gesamtvolumen und der somit geringeren Verdünnung des geschlossenen Systems liegen.

Jedes Gewebe im Körper kann Laktat synthetisieren bzw. verwerten. Es wird bei der Glykolyse unter anaeroben Bedingungen aus Pyruvat hergestellt. Unter physiologischen Bedingungen ist die arteriovenöse Laktatdifferenz innerhalb der Lunge klein bzw. gleich null (de Backer et al. 1997). In mehreren Studien wurde die Laktatproduktion in der Lunge bei verschiedenen Typen akuter Lungenschädigungen studiert (Brown et al. 1996, de Backer et al. 1997, Kellum et al. 1997). In der größten davon berichten de Backer und Kollegen von einer erhöhten Laktatproduktion vor allem bei Patienten mit akuten Lungenversagen (ARDS) sowie einem proportionalen Anstieg zum Ausmass des Schadens (de Backer et al. 1997). Bei anderen Typen der respiratorischen Insuffizienz blieben die Laktatdifferenzen im Normalbereich.

Eine Hypoxie im Lungengewebe muss nicht allein Ursache für erhöhte Laktatspiegel sein. Er kann auch Zeichen eines erhöhten Metabolismus im Parenchymgewebe und in inflammatorischen Zellen sein, welche das Organ infiltrieren (Iscra et al. 2002). Erhöhte Laktatspiegel könnten demnach Auskunft über einen stattfindenden Lungenschaden bzw. einen inflammatorischen Prozess geben.

Koike et al. haben hierzu 2011 interessante Daten veröffentlicht. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen ansteigenden Laktat-Werten während azellulärer EVLP und den Ergebnissen nach Transplantation dieser Spenderlungen (Koike et al. 2011). Letztendlich konnten sie keinen Prognosefaktor hieraus ableiten, sondern postulieren einen „wash-out“-Effekt, da die natürliche Clearance-Funktion durch Leber und Niere in einem EVLP-Setting fehlt.

Die Natriumwerte stiegen während der Versuchsdauer von anfänglichen Normbereichen deutlich an. Teilweise lagen sie zu Reperfusionbeginn bereits über dem Normbereich. Eine mögliche Ursache für den unphysiologischen Anstieg des Natriums könnte die Tatsache sein, dass der pH-Wert stets mit Natrium-Bicarbonat ausgeglichen wurde. Diese häufige Puffer-Zugabe könnte den Anstieg in der Perfusionsflüssigkeit erklären. Die Kaliumwerte dagegen bewegen sich während der gesamten Versuchsdauer in physiologischen Normbereichen, woraus man schließen könnte, dass die Integrität der pulmonalen Zellen intakt war.

Möglicherweise ist gerade das geringe Volumen auch bei den Elektrolytverschiebungen ein Problem. Vorstellbar wäre eine Toxinausschüttung, die in einem System mit weniger Volumen mehr Auswirkung auf das Organ hat als in einem großvolumigen Perfusionssystem.

4.5 Limitation der Arbeit

Als Limitation der Arbeit gilt es sicherlich zu erwähnen, dass bei allen aufgeführten Versuchgruppen am Ende der EVLP keine Transplantation des Organs durchgeführt worden ist. Mit diesem letzten Schritt wäre die Beurteilung der Organfunktion noch eindeutiger und aussagekräftiger gewesen.

4.6 Ausblick

Welche Bedeutung haben nun unsere Ergebnisse? Mit unserem ex-vivo-Reperusionsmodell konnten wir erfolgreich zeigen, dass eine Weiterführung der Lungenfunktion nach Organentnahme über einen Zeitraum von 6 Stunden problemfrei möglich ist. Gegenstand dieser Arbeit war zwar vornehmlich eine Optimierung des bestehenden Systems, jedoch konnte in vorherigen Versuchsgruppen gezeigt werden, dass auch durch Aspiration oder durch Hirntod geschädigte Spenderlungen durch geeignete intensivmedizinische Maßnahmen in ihrer Funktion verbessert werden konnten (Wipper et al. 2008).

Unser ex-vivo-Reperusionsmodell zielt darauf ab, die ohnehin schon geringe Anzahl geeigneter Spenderlungen zu erhöhen, indem zunächst zur Transplantation abgelehnte Lungen rekonditioniert werden, um sie in einen transplantierbaren Zustand zu überführen. Die Perfusionsdauer von 6h oder mehr kann hierzu genutzt werden, um die Lungenfunktion zu evaluieren bzw. um Medikamente oder andere intensivmedizinische Behandlungen zuzuführen.

Innerhalb unserer Forschungsgruppe wurde zum Beispiel vielversprechend die Applikation von ATG (Anti-Thymozyten-Globulin) untersucht. Hierbei wurde bereits dem Spender ATG verabreicht, was sich später bei der Reperfusion positiv auf die Lungenfunktion auswirkte.

Mit derlei Maßnahmen eröffnen sich im Bereich der Lungentransplantationschirurgie neue Möglichkeiten. Im Allgemeinen gilt, dass Spenderorgane zur Verlängerung der Ischämiezeit gekühlt werden. Jedoch verlangsamt diese Kühlung den Metabolismus und macht damit gleichzeitig die Möglichkeit regenerativer Prozesse zunichte (Snell et al. 2011). Eine ex-vivo Lungenperfusion kann hier neben der Evaluierung der Funktionalität des Spenderorgans ansetzen und unter normothermen Zuständen diese Prozesse wiederbeleben oder eben noch einen Schritt weitergehen durch die Applikation von Medikamenten oder anderen intensivmedizinischen Maßnahmen (Rosso et al. 2018). Exemplarisch sei hier die Applikation von Trimetazidin – einem antiischämischen Medikament zur Behandlung der stabilen Angina pectoris - genannt. Cosgun et al. konnte hierdurch im Schweinetiermodell verbesserte Lungenfunktionen nach Transplantation nachweisen (Cosgun et al. 2017).

Zudem gewinnt man etwas Zeit, die wiederum für weitere Spender- und Empfängertest genutzt werden können. Vielversprechend sind hier zum Beispiel die Identifikation von Biomarkern wie Endothelin-1 oder IL-8 im Perfusat als Prognosefaktor für die Organqualität oder auch ein PGD (primary graft dysfunction) nach Transplantation der Spenderlunge (Machuca et al. 2015). Denkbar ist auch der Einsatz von Immun-, Gen- oder Stammzelltherapie (Rosso et al. 2018).

Mittlerweile hat sich die ex-vivo Lungenperfusion weltweit zunehmend als ernstzunehmendes Instrument zur Erweiterung des Organspendepools bei Lungentransplantation etabliert. Die ersten Ergebnisse groß angelegter Studien wie NOVEL, DEVELOP-UK, EXPAND und INSPIRE sind vielversprechend. Hinsichtlich Morbidität und Mortalität unterscheiden sich die kurz- und mittelfristigen Outcomes von Spenderlungen nach EVLP nicht signifikant von konventionell durchgeführten Lungentransplantationen. Daten über Langzeitergebnisse werden werden in nächster Zeit erwartet.

5 Zusammenfassung

Hintergrund dieser Arbeit

Die geringe Zahl verfügbarer und geeigneter Organe für die Lungentransplantation bei der Therapie von terminalen Lungenerkrankungen ist ein limitierender Faktor. Es gibt verschiedene Strategien zur Erweiterung des Organspenderpools, hierzu gehört auch eine ex-vivo Rekonditionierung von primär zur Transplantation abgelehnten Spenderlungen.

Fragestellung und Methoden

In unserer Arbeitsgruppe wurde im Großtiermodell ein ex-vivo Modell entwickelt, mit dem Spenderlungen von Schweinen untersucht werden können. Nach Explantation des Herz-Lungenblock wird das Organ in einen Kreislauf eingebunden und über einen Zeitraum von 6h perfundiert und ventiliert. Im Rahmen dieser Promotion wurden die Veränderung der mechanischen Systemkomponenten sowie die Perfusion des Organs mit azellulärer Flüssigkeit untersucht. Die hämodynamischen und respiratorischen Parameter der Kontrollgruppe (n=7), bestehend aus einem offenen Perfusionskreislaufsystem mit Rollerpumpe wurden mit einer zweiten Gruppe (n=6), bestehend aus einem geschlossenen System mit Zentrifugalpumpe verglichen. Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung möglicher Auswirkungen einer azellulären Perfusion (Gruppe 3, n=8) gegenüber einer zellhaltigen Perfusion (Gruppe 2).

Ergebnisse

Beim Vergleich des offenen Systems (Gruppe1) mit dem geschlossenen System (Gruppe 2) zeigte sich in unserem Modell kein zusätzlicher Nutzen durch die Umstellung der Systemkomponenten. Beide Systeme erlauben eine sichere Langzeitperfusion über 6h. Bei Anwendung der Transplantabilitätskriterien erfüllten in Gruppe 1 alle Versuchslungen (n=7), in Gruppe 2 jedoch nur 4 von 6 Lungen die Anforderungen. Eine Perfusion der Versuchslungen mit zellfreier Lösung (Gruppe 3) zeigte lediglich einen Vorteil bei der Reduzierung des PVR (pulmonary vascular resistance). Bei Anwendung der Transplantabilitätskriterien erfüllten nur 7 von 8 Versuchslungen die Kriterien.

Schlussfolgerung

Eine ex-vivo Lungenperfusion (EVLP) zur Rekonditionierung vorgeschädigter Lungen bietet die Möglichkeit ein Organ hinsichtlich seiner Funktionsfähigkeit zu überprüfen bzw. durch intensivmedizinische Maßnahmen zu verbessern, da eine Perfusion von mindestens 6 Stunden problemlos erzielt werden kann. In unserer Studie brachte weder die Anwendung eines geschlossenen Systems noch die Umstellung auf eine zellfreie Perfusionslösung einen relevanten Vorteil.

Summary

Background

The lack of available and suitable organs for lung transplantation in the therapy of end-stage lung diseases is a limiting factor. There are different strategies of extending the pool of donor organs, one of them is a ex-vivo reconditioning of donor organs initially declined for transplantation.

Purpose and methods

In our group we established an ex-vivo model for examination of donor pig lungs. After explantation of the heart-lung-block we integrated the organs in a circuit for perfusion and ventilation for 6 hours. In this study we investigated the change of mechanical components and also the change from cellular to acellular perfusate. We compared the result of the control group (n=7) - open circuit driven by a roller pump - to a second group (n=6) with a closed setup and centrifugal pump. Next purpose of investigation was the effect of acellular perfusate (group 3, n=8) in comparison to a cellular perfusate (group 2).

Results

We showed in our reperfusion model, that there is no benefit by changing the mechanical setup. Both setups make a secure long term perfusion for 6 hours and more possible. In group 1 all donor lungs were rated suitable for transplantation while in group 2 only four of six fulfilled the transplant criteria. The perfusion with acellular fluid in the circuit showed in the end only a lower PVR (pulmonary vascular resistance) compared to the cellular perfusate. Seven of eight organs were rated suitable for potential transplantation.

Conclusion

Ex-vivo lung perfusion (EVLP) is a usefull platform to recondition damaged donor lungs allowing analyses of pulmonary function and medical treatment during feasible perfusion time of at least 6 hours. In our studies neither use of a closed, minimized perfusion circuit nor cell free perfusion brought any relevant advantages in this process.

6 Literaturverzeichnis

1. **Arcasoy SM** (2009): Editorial introduction: current state of lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009 Okt;14(5):463-465.
2. **Andreasson AS**, Dark JH, Fisher AJ (2014): Ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation--state of the art. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Nov;46(5):779-88.
3. **Becker S**, Steinmeyer J, Avsar M, Höffler K, Salman J, Haverich A, Warnecke G, Ochs M, Schnapper A. (2016): Evaluating acellular versus cellular perfusate composition during prolonged ex vivo lung perfusion after initial cold ischaemia for 24 hours. *Transpl Int.* 2016 Jan;29(1):88-97.
4. **Bhorade SM**, Vigneswaran W, McCabe MA, Garrity ER (2000): Liberalization of donor criteria may expand the donor pool without adverse consequence in lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant* 2000 Dez;19(12):1199-1204.
5. **Botha P** (2009): Extended donor criteria in lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009 Apr;14(2):206-210.
6. **Brown SD**, Clark C, Gutierrez G (1996): Pulmonary lactate release in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care* 1996 März;11(1):2-8.
7. **Christie JD**, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI (2010): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report--2010. *J. Heart Lung Transplant* 2010 Okt;29(10):1104-1118.
8. **Cobelens PM**, van Putte BP, Kavelaars A, Heijnen CJ, Kesecioglu J. (2009): Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. *J. Surg. Res* 2009 Mai;153(2):295-301.
9. **Cooper JD** (1987): Lung transplantation: A new era. *Ann. Thorac. Surg.* 1987, Nov;44(5): 447-48.
10. **Cooper JD**, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M and DeMajo WA (1987): Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1987; 93(2): 173-81.

11. **Cosgun T**, Iskender I, Yamada Y, Arni S, Lipiski M, van Tilburg K, Weder W, Inci I (2017): Ex vivo administration of trimetazidine improves post-transplant lung function in pig model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2017 Jul 1;52(1):171-177.
12. **Cypel M**, Liu M, Rubacha M, Yeung JC, Hirayama S, Anraku M, Sato M, Medin J, Davidson BL, de Perrot M, Waddell TK, Slutsky AS, Keshavjee S (2009): Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. *Sci Transl Med* 2009 Okt;1(4):4ra9.
13. **Cypel M**, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M, Fischer S, Hwang D, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Liu M, Keshavjee S (2009): Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am. J. Transplant* 2009 Okt;9(10):2262-2269.
14. **Cypel M**, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, Sato M, Harwood S, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Liu M, Keshavjee S. (2008): Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J. Heart Lung Transplant* 2008 Dez;27(12):1319-1325.
15. **Cypel M**, Yeung JC, Keshavjee S (2011): Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and ex vivo conditioning. *Clin. Chest Med* 2011 Juni;32(2):233-244.
16. **Cypel M**, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow CW, Chaparro C, Hutcheon M, Singer LG, Slutsky AS, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, Keshavjee S. (2011): Normothermic Ex Vivo Lung Perfusion in Clinical Lung Transplantation. *N Engl J Med.* 2011Apr 14;364(15):1431-40.
17. **de Backer D**, Creteur J, Zhang H, Norrenberg M, Vincent JL (1997): Lactate production by the lungs in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1997 Okt;156(4 Pt 1):1099-1104.
18. **de Perrot M**, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S (2003): Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2003 Feb;167(4):490-511.
19. **de Perrot M**, Weder W, Patterson GA, Keshavjee S (2004): Strategies to increase limited donor resources. *Eur Respir J.* 2004; 23(3):477-82. Review.
20. **Driessen JJ**, Fransen G, Rondelez L, Schelstraete E, Gevaert L. Comparison of the standard roller pump and a pulsatile centrifugal pump for extracorporeal circulation during routine coronary artery bypass grafting. *Perfusion* 1991;6(4):303-311.

21. **Egan TM**, Boychuk JE, Rosato K, Cooper JD (1992): Whence the lungs? A study to assess suitability of donor lungs for transplantation. *Transplantation* 1992 Feb;53(2):420-422.
22. **Egan TM**, Haithcock JA, Nicotra WA, Koukoulis G, Inokawa H, Sevala M, Molina PL, Funkhouser WK, Mattice BJ (2006): Ex vivo evaluation of human lungs for transplant suitability. *Ann. Thorac. Surg* 2006 Apr;81(4):1205-1213.
23. **Erasmus ME**, Fernhout MH, Elstrodt JM, Rakhorst G(2006): Normothermic ex vivo lung perfusion of non-heart-beating donor lungs in pigs: from pretransplant function analysis towards a 6-h machine preservation. *Transpl. Int* 2006 Juli;19(7):589-593.
24. **Fan Y**, Xiao Y-B, Weng Y-G (2009): Tacrolimus versus cyclosporine for adult lung transplant recipients: a meta-analysis. *Transplant. Proc* 2009 Juni;41(5):1821-1824.
25. **Ferraris VA**, Ferraris SP, Saha SP, Hessel EA 2nd, Haan CK, Royston BD, Bridges CR, Higgins RSD, Despotis G, Brown JR, Spiess BD, Shore-Lesserson L, Stafford-Smith M, Mazer CD, Bennett-Guerrero E, Hill SE, Body S. (2007): Perioperative blood transfusion and blood conservation in cardiac surgery: the Society of Thoracic Surgeons and The Society of Cardiovascular Anesthesiologists clinical practice guideline. *Ann. Thorac. Surg* 2007 Mai;83(5 Suppl):S27-86.
26. **Fischer S**, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, Liu M, Keshavjee S. (2000): Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann. Surg* 2000 März;231(3):424-431.
27. **Fiser SM**, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, Kern JA, Kron IL. (2001): Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 2001 Juni;121(6):1069-1075.
28. **Grover FL**, Fullerton DA, Zamora MR, Mills C, Ackerman B, Badesch D, Brown JM, Campbell DN, Chetham P, Dhaliwal A, Diercks M, Kinnard T, Niejadlik K, Ochs M (1997): The past, present, and future of lung transplantation. *Am. J. Surg* 1997 Juni;173(6):523-533.
29. **Hardy JD**, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. (1963): Lung Homotransplantation in man. *JAMA*. 1963 Dec 21;186:1065-74.
30. **Hardy JD** (1999): The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar;31(1-2):25-9.

31. **Ingemansson R**, Eyjolfsson A, Mared L, Pierre L, Algotsson L, Ekmehag B, Gustafsson R, Johnsson P, Koul B, Lindstedt S, Lühns C, Sjöberg T, Steen S(2009): Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Ann. Thorac. Surg* 2009 Jan;87(1):255-260.
32. **Iscra F**, Gullo A, Biolo G (2002): Bench-to-bedside review: lactate and the lung. *Crit Care* 2002 Aug;6(4):327-329.
33. **Jensen E**, Andréasson S, Bengtsson A, Berggren H, Ekroth R, Lindholm L, Ouchterlony J (2003): Influence of two different perfusion systems on inflammatory response in pediatric heart surgery. *Ann. Thorac. Surg* 2003 März;75(3):919-925.
34. **Konstantinov IE** (1998): A mystery of Vladimir P. Demikhov: the 50th anniversary of the first intrathoracic transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1998 Apr;65(4):1171-7.
35. **Kellum JA**, Kramer DJ, Lee K, Mankad S, Bellomo R, Pinsky MR (1997): Release of lactate by the lung in acute lung injury. *Chest* 1997 Mai;111(5):1301-1305.
36. **Koike T**, Yeung JC, Cypel M, Rubacha M, Matsuda Y, Sato M, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. (2011): Kinetics of lactate metabolism during acellular normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Dec;30(12):1312-9.
37. **Kotloff RM**, Thabut G (2011): Lung Transplantation [Internet]. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 März; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471083>
38. **Lama VN** (2009): Update in lung transplantation 2008. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2009 Mai;179(9):759-764.
39. **Lardinois D**, Banysch M, Korom S, Hillinger S, Rousson V, Boehler A, Speich R, Weder W (2005): Extended donor lungs: eleven years experience in a consecutive series. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005 Mai;27(5):762-767.
40. **Lee JC**, Christie JD (2009): Primary graft dysfunction. *Proc Am Thorac Soc* 2009 Jan;6(1):39-46.
41. **Lee SS**, Antaki JF, Kameneva MV, Dobbe JG, Hardeman MR, Ahn KH, Lee SJ (2007): Strain hardening of red blood cells by accumulated cyclic supraphysiological stress. *Artif Organs* 2007 Jan;31(1):80-86.
42. **Linacre V**, Cypel M, Machuca T, Nakajima D, Hashimoto K, Zamel R, Chen M, Iskender I, Dos Santos P, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. (2016): Importance of left atrial pressure during ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Jun;35(6):808-14.

-
43. **Lindholm L**, Westerberg M, Bengtsson A, Ekroth R, Jensen E, Jeppsson A (2004): A closed perfusion system with heparin coating and centrifugal pump improves cardiopulmonary bypass biocompatibility in elderly patients. *Ann. Thorac. Surg* 2004 Dez;78(6):2131-2138; discussion 2138.
 44. **Luc JGY**, Aboelnazar NS, Himmat S, Hatami S, Haromy A, Matsumura N, Vasanthan V, White CW, Mengel M, Freed DH, Nagendran J (2017): A Leukocyte Filter Does Not Provide Further Benefit During Ex Vivo Lung Perfusion. *ASAIO J.* 2017 Sep/Oct;63(5): 672-678.
 45. **Machuca TN**, Cypel M. (2014): Ex vivo lung perfusion. *Thorac Dis.* 2014 Aug;6(8):1054-62.
 46. **Machuca TN**, Cypel M, Zhao Y, Grasemann H, Tavasoli F, Yeung JC, Bonato R, Chen M, Zamel R, Chun YM, Guan Z, de Perrot M, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S (2015): The role of the endothelin-1 pathway as a biomarker for donor lung assessment in clinical ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant.* 2015 Jun;34(6):849-57.
 47. **Machuca TN**, Cypel M, Yeung JC, Bonato R, Zamel R, Chen M, Azad S, Hsin MK, Saito T, Guan Z, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S (2015): Protein expression profiling predicts graft performance in clinical ex vivo lung perfusion. *Ann Surg.* 2015 Mar;261(3):591-7.
 48. **Makdisi G**, Makdisi T, Jarmi T, Caldeira CC (2017): Ex vivo lung perfusion review of a revolutionary technology. *Ann Transl Med.* 2017 Sep;5(17):343. Review.
 49. **Moen O**, Fosse E, Bråten J, Andersson C, Fagerhol MK, Venge P, Høgåsen K, Mollnes TE (1994): Roller and centrifugal pumps compared in vitro with regard to haemolysis, granulocyte and complement activation. *Perfusion* 1994 März;9(2):109-117.
 50. **Moen O**, Fosse E, Dregelid E, Brockmeier V, Andersson C, Høgåsen K, Venge P, Mollnes TE, Kierulf P (1996): Centrifugal pump and heparin coating improves cardiopulmonary bypass biocompatibility. *Ann. Thorac. Surg* 1996 Okt;62(4):1134-1140.
 51. **Mühlfeld C**, Müller K, Pallesen L-P, Sandhaus T, Madershahian N, Richter J, Wahlers T, Wittwer T, Ochs M (2007): Impact of preservation solution on the extent of blood-air barrier damage and edema formation in experimental lung transplantation. *Anat Rec (Hoboken)* 2007 Mai;290(5):491-500.

-
52. **Murphy GS**, Hessel EA 2nd, Groom RC (2009): Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach. *Anesthesia and Analgesia* 108, no. 5 (Mai 2009): 1394-1417.
 53. **Neyrinck AP**, Van De Wauwer C, Geudens N, Rega FR, Verleden GM, Wouters P, Lerut TE, Van Raemdonck DEM (2006): Comparative study of donor lung injury in heart-beating versus non-heart-beating donors. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006 Okt;30(4):628-636.
 54. **Nilsson T**, Gielis JF, Slama A, Hansson C, Wallinder A, Ricksten SE, Dellgren G. (2017): Comparison of two strategies for ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Jul 8. pii: S1053-2498(17)31883-1.
 55. **Nishida H**, Aomi S, Tomizawa Y, Endo M, Koyanagi H, Nojiri C, Oshiyama H, Kido T, Yokoyama K (1999): Comparative study of biocompatibility between the open circuit and closed circuit in cardiopulmonary bypass. *Artif Organs* 1999 Juni;23(6):547-551.
 56. **Novitzky D**, Wicomb WN, Rose AG, Cooper DK, Reichart B (1987): Pathophysiology of pulmonary edema following experimental brain death in the chacma baboon. *Ann. Thorac. Surg* 1987 März;43(3):288-294.
 57. **Orens JB**, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, Egan T, Keshavjee S, Knoop C, Kotloff R, Martinez FJ, Nathan S, Palmer S, Patterson A, Singer L, Snell G, Studer S, Vachieri JL, Glanville AR (2006): International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant* 2006 Juli;25(7):745-755.
 58. **Patterson GA**, Cooper JD, Goldman B, Weisel RD, Pearson FG, Waters PF, Todd TR, Scully H, Goldberg M, Ginsberg RJ (1988): Technique of successful clinical double-lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg* 1988 Juni;45(6):626-633.
 59. **Pêgo-Fernandes PM**, Mariani AW, de Medeiros IL, Pereira AE de A, Fernandes FG, do Valle Unterpertinger F, Canzian M, Jatene FB (2010): Ex vivo lung evaluation and reconditioning. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010 Dez;25(4):441-446.
 60. **Pierre AF**, Sekine Y, Hutcheon MA, Waddell TK, Keshavjee SH (2002): Marginal donor lungs: a reassessment. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 2002 März;123(3):421-427; discussion, 427-428.

61. **Pierson RN 3rd** (2006): Lung transplantation: current status and challenges. *Transplantation* 2006 Juni;81(12):1609-1615.
62. **Popov AF**, Sabashnikov A, Patil NP, Zerriouh M, Mohite PN, Zych B, Saez DG, Schmack B, Ruhparwar A, Dohmen PM, Karck M, Simon AR, Weymann A. (2015): Ex vivo lung perfusion - state of the art in lung donor pool expansion. *Med Sci Monit Basic Res.* 2015 Feb 3;21:9-14. Review.
63. **Rega FR**, Jannis NC, Verleden GM, Lerut TE, Van Raemdonck DEM (2003): Long-term preservation with interim evaluation of lungs from a non-heart-beating donor after a warm ischemic interval of 90 minutes. *Ann. Surg* 2003 Dez;238(6):782-792; discussion 792-793.
64. **Rega FR**, Neyrinck AP, Verleden GM, Lerut TE, Van Raemdonck DEM (2004): How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor? *Ann. Thorac. Surg* 2004 Feb;77(2):438-444; discussion 444.
65. **Roman M**, Gjorgjimajkoska O, Neil D, Nair S, Colah S, Parmar J, Tsui S (2015): Comparison between cellular and acellular perfusates for ex vivo lung perfusion in a porcine model. *J Heart Lung Transplant.* 2015 Jul;34(7):978-87.
66. **Rosso L**, Zanella A, Righi I, Barilani M, Lazzari L, Scotti E, Gori F, Mendogni P. (2018): Lung transplantation, ex-vivo reconditioning and regeneration: state of the art and perspectives *J Thorac Dis.* 2018 Jul;10(Suppl 20): S2423-S2430.
67. **Rotta AT**, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM (1999): Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. *J Crit Care.* 1999 Jun;14(2):84-92.
68. **Sanchez PG**, Mackowick KM, Kon ZN (2016): Current state of ex-vivo lung perfusion *Curr Opin Organ Transplant.* 2016 Jun;21(3):258-66.
69. **Schiavon M**, Falcoz PE, Santelmo N, Massard G (2011): Does the use of extended criteria donors influence early and long-term results of lung transplantation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012 Feb;14(2):183-7.
70. **Schönberger JP**, Everts PA, Hoffmann JJ (1995): Systemic blood activation with open and closed venous reservoirs. *Ann. Thorac. Surg* 1995 Juni;59(6):1549-1555.
71. **Schumer EM**, Zoeller KA, Linsky PL, Monreal G, Choi Y, Giridharan GA, Sobieski MA, Slaughter MS, van Berkel VH (2015): Feasibility Study of Pulsatile Left Ventricular

-
- Assist Device for Prolonged Ex Vivo Lung Perfusion. *Ann Thorac Surg.* 2015 Jun;99(6):1961-7.
72. **Snell GI**, Paraskeva M, Westall GP (2011): Selection and management of the lung donor. *Clin Chest Med* 2011;32:223-32
73. **Steen S**, Ingemansson R, Eriksson L, Pierre L, Algotsson L, Wierup P, Liao Q, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Sjöberg T (2007): First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo. *Ann. Thorac. Surg* 2007 Juni;83(6):2191-2194.
74. **Steen S**, Liao Q, Wierup P, Qiumin L, Wierup PN (2003): Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex-vivo. *Ann Thorac Surg.* 2003;76:244-52.
75. **Steen S**, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. (2001): Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 2001 März;357(9259):825-829.
76. **Straznicka M**, Follette DM, Eisner MD, Roberts PF, Menza RL, Babcock WD (2002): Aggressive management of lung donors classified as unacceptable: excellent recipient survival one year after transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 2002 Aug;124(2):250-258.
77. **Strüber M**, Hohlfeld JM, Kofidis T, Warnecke G, Niedermeyer J, Sommer SP, Haverich A (2002): Surfactant function in lung transplantation after 24 hours of ischemia: advantage of retrograde flush perfusion for preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 2002 Jan;123(1):98-103.
78. **Tanaka H**, Oshiyama T, Narisawa T, Mori T, Masuda M, Kishi D, Kitou T, Miyazima S (2003): Clinical study of biocompatibility between open and closed heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits. *J Artif Organs* 2003;6(4):245-252.
79. **Toronto Lung Transplant Group** (1986): Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 1986 May 1;314(18):1140-5.
80. **Unknown** (1985): Position of the American Heart Association on research animal use. *Circulation* 1985 Apr;71(4):849A-50A.
81. **Van Putte BP**, Kesecioglu J, Hendriks JMH, Persy VP, van Marck E, Van Schil PEY, De Broe ME (2005): Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. *Crit Care* 2005 Feb;9(1):R1-8.
82. **Van Raemdonck D** (2010): Thoracic organs: current preservation technology and future prospects; part 1: lung. *Curr Opin Organ Transplant* 2010 Apr;15(2):150-155.

-
83. **Van Raemdonck D**, Neyrinck A, Cypel M, Keshavjee S (2015): Ex-vivo lung perfusion. *Transpl Int.* 2015 Jun;28(6):643-56.
 84. **Van Raemdonck D**, Neyrinck A, Verleden GM, Dupont L, Coosemans W, Decaluwé H, Decker G, De Leyn P, Naftoux P, Lerut T (2009): Lung donor selection and management. *Proc Am Thorac Soc* 2009 Jan;6(1):28-38.
 85. **Van Raemdonck D**, Rega F, Rex S, Neyrinck A (2018): Machine perfusion on thoracic organs. *J Thorac Dis.* 2018 Apr;10(Suppl 8):S910-S923.
 86. **Varela A**, Cordoba M, Serrano-Fiz S, Burgos R, Montero CG, Téllez G, Novoa N, Castedo E, Tebar E, Téllez J, Roda J, Ugarte J (1997): Early lung allograft function after retrograde and antegrade preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 1997 Dez;114(6):1119-1120.
 87. **Wallinder A**, Riise GC, Ricksten SE, Silverborn M, Dellgren G (2016): Transplantation after ex vivo lung perfusion: A midterm follow-up. *Heart Lung Transplant.* 2016 Nov;35(11):1303-1310.
 88. **Wan S**, LeClerc JL, Vincent JL (1997): Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 1997 Sep;112(3):676-692.
 89. **Watanabe N**, Sakota D, Ohuchi K, Takatani S (2007): Deformability of red blood cells and its relation to blood trauma in rotary blood pumps. *Artif Organs* 2007 Mai;31(5):352-358.
 90. **Weiss SJ**, Klein R, Slivka A, Wei M (1982): Chlorination of taurine by human neutrophils. *J Clin. Invest* 70, 598-607.
 91. **Welbourn CR**, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB (1991): Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991 Juni;78(6):651-655.
 92. **Wierup P**, Haraldsson A, Nilsson F, Pierre L, Scherstén H, Silverborn M, Sjöberg T, Westfeldt U, Steen S (2006): Ex vivo evaluation of nonacceptable donor lungs. *Ann. Thorac. Surg* 2006 Feb;81(2):460-466.
 93. **Wilkes DS**, Egan TM, Reynolds HY (2005): Lung transplantation: opportunities for research and clinical advancement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2005 Okt;172(8):944-955.

-
94. **Wipper S**, Martens B, Dupree A, et al. (2008): Development and Evaluation of an in-vitro Reperfusion Circuit for Reconditioning of predamaged Donor-Lungs. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:S201.
 95. **Wipper S**, Schirmer J, Martens B, et al. (2007): A new concept of reconditioning predamaged donor lungs in an ex-vivo reperfusion pig model. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26:S111.
 96. **Wittwer T**, Franke U, Fehrenbach A, Meyer D, Sandhaus T, Pfeifer F, Dreyer N, Mueller T, Schubert H, Richter J, Wahlers T (2004): Impact of retrograde graft preservation in Perfadex-based experimental lung transplantation. *J. Surg. Res* 2004 Apr;117(2):239-248.
 97. **Wittwer T**, Franke UFW, Fehrenbach A, Ochs M, Sandhaus T, Schuette A, Richter S, Dreyer N, Knudsen L, Müller T, Schubert H, Richter J, Wahlers T (2005): Experimental lung transplantation: impact of preservation solution and route of delivery. *J. Heart Lung Transplant* 2005 Aug;24(8):1081-1090.
 98. **Yeung JC**, Cypel M, Machuca TN, Koike T, Cook DJ, Bonato R, Chen M, Sato M, Waddell TK, Liu M, Slutsky AS, Keshavjee S (2012): Physiologic assessment of the ex vivo donor lung for transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Oct;31(10):1120-6.
 99. **Yusen RD**, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Rossano JW, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation (2016): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Oct;35(10):1170-1184.

7 Abkürzungsverzeichnis

AHV	Atemhubvolumen
ARDS	acute respiratory distress syndrome
CBP	cardio-pulmonaler bypass
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et altera, und andere
EVLP	ex-vivo Lungenperfusion
F	French
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
I.E.	internationale Einheiten
I:E	Inspiration:Expiration
KG	Körpergewicht
LA	left atrium, linker Vorhof
LIS	lung injury score
LML	linker Mittellappen (Lunge)
LOL	linker Oberlappen (Lunge)
LUL	linker Unterlappen (Lunge)
MAD	mittlerer arterieller Druck
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchstiere
NO	Stickstoffmonoxid
PA	Pulmonalarterie
PCR	polymerase chain reaction
PDI	pulmonary deflation index
PEEP	positive end-expiratory pressure

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POC	pulmonary oxygenation index, Oxygenierungskoeffizient
PVR	pulmonary vessel resistance, Pulmonaler Gefäßwiderstand
RML	rechter Mittellappen (Lunge)
ROL	rechter Oberlappen (Lunge)
rpm	rounds per minute
RR	Blutdruck
RUL	rechter Unterlappen (Lunge)
Stabw	Standardabweichung
SVR	systemischer Gefäßwiderstand
ZVD	zentralvenöser Druck

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:	Seite
1. Schemazeichnung offenes Reperfusionssystem	11
2. Offenes Reperfusionssystem	12
3. Plexiglaskasten	12
4. Schemazeichnung geschlossenes Reperfusionssystem	13
5. Geschlossenes Reperfusionssystem	13
6. Organ mit Kanüle	27
7. Kanüle	27
8. POC Gruppe 1 vs. 2	31
9. Compliance Gruppe 1vs. 2	33
10. LA-Druck Gruppe 1 vs. 2	34
11. PA-Druck Gruppe 1vs. 2	34
12. PVR Gruppe 1vs. 2	36
13. PDI Gruppe 1vs. 2	37
14. Gesamt-wet-dry-ratio Gruppe 1vs. 2	37
15. Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio Gruppe 1vs. 2	38
16. Lung injury score Gruppe 1vs. 2	39
17. Nativpräparat Gruppe 1	39
18. Nativpräparat Gruppe 2	39
19. MPO gesamt Gruppe 1vs. 2	40
20. MPO lappenbezogen Gruppe 1vs. 2	40
21. POC Gruppe 2 vs. 3	42
22. Compliance Gruppe 2 vs. 3	43
23. LA-Druck Gruppe 2 vs. 3	44
24. PA-Druck Gruppe 2 vs. 3	44
25. PVR Gruppe 2 vs. 3	45
26. PDI Gruppe 2 vs. 3	46
27. Gesamt-wet-dry-ratio Gruppe 2 vs. 3	47

28. Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio Gruppe 2 vs. 3	48
29. Lung injury score Gruppe 2 vs. 3	48
30. MPO gesamt Gruppe 2 vs. 3	49
31. MPO lappenbezogen Gruppe 2 vs. 3	50

Tabellen:	Seite
1. Auswahlkriterien von Lungenspendern	5
2. Versuchsgruppen	10
3. In situ-Parameter	18
4. Reperusionsprotokoll	21
5. Beatmungsprotokoll	22
6. Pulmonary Deflation Index (PDI)	22
7. Lung injury score (LIS)	23
8. Schädigungsart und Vergrößerung	24
9. POC Gruppe 1 vs. 2	31
10. CO ₂ -Differenz Gruppe 1 vs. 2	32
11. PVR Gruppe 1 vs. 2	35
12. PDI Gruppe 1 vs. 2	36
13. Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio Gruppe 1 vs. 2	38
14. POC Gruppe 2 vs. 3	41
15. CO ₂ -Differenz Gruppe 2 vs. 3	42
16. Compliance Gruppe 2 vs. 3	43
17. PVR Gruppe 2 vs. 3	45
18. PDI Gruppe 2 vs. 3	46
19. Lungenlappenbezogene wet-dry-ratio Gruppe 2 vs. 3	47
20. Na ⁺ -Werte	51
21. K ⁺ -Werte	52
22. Laktatanstieg	52

9 Anhang

9.1 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Florian M. Wagner für die fortwährende und ausdauernde Unterstützung während der Bearbeitung meiner Dissertation. Ebenso möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. med. Sabine H. Wipper für ihr Engagement sowie zahlreichen Hilfestellung danken. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Labors für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der anschließenden Aufarbeitung der gewonnenen Proben.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht zu jedem Zeitpunkt während dieser Arbeit.

9.2 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: