

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Becker**

**Ischämie- und Reperfusionsschaden nach orthotoper  
Lebertransplantation am Schwein –  
Glutathion-S-Transferase als Parameter zum Vergleich  
verschiedener Reperusionsstrategien**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin  
der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu  
Tübingen**

**vorgelegt von  
Mirjam Dorothea Busch  
aus Esslingen am Neckar  
2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Viebahn
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1. Der Ischämie- und Reperfusionsschaden bei Lebertransplantation .....	5
1.2. Volumensubstitution mit hyperten-isoosmotischen Lösungen .....	9
1.3. Diaspirin Crosslinked Hemoglobin — DCLHb.....	11
1.4. Glutathion-S-Transferasen .....	12
1.5. Alpha-Glutathion-S-Transferase .....	14
1.6. Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1. Versuchstiere.....	18
2.2. Konservierungslösung .....	18
2.3. Zusammensetzung der Volumenersatzlösungen.....	18
2.4. Operationsvorbereitung .....	19
2.5. Anästhesie.....	20
2.6. Spenderoperation .....	20
2.7. Bypassverfahren.....	22
2.8. Empfängeroperation .....	23
2.9. Meßzeitpunkte und Meßparameter.....	26
2.10. Probenbearbeitung .....	28
2.11. Bestimmung der Glutathion-S-Transferase.....	29
2.11.2. Bestimmung der Enzymaktivität von GST im Serum.....	29
2.11.3. Bestimmung der Konzentration von $\alpha$ -GST im Serum .....	29
2.12. Messung des arteriellen Blutflusses in der Leber mit fluoreszierenden Microspheres .....	30
2.13. Messung des hepatischen Blutflusses mit Ultraschall-Flow-Probes ...	30
2.14. Statistik .....	30
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1. Glutathion-S-Transferase als valider Parameter für das Ausmaß des Ischämie- und Reperfusionsschadens.....	31
3.1.1. Verlauf der Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST im Serum ab Beginn der Reperfusion.....	31

---

3.1.2. Die Enzymaktivitäten im Spenderorganismus vor Hepatektomie ...	35
3.1.3. Korrelation des Ischämieschadens mit dem Reperfusionsschaden anhand der Enzymaktivitäten .....	37
3.1.4. Korrelation der enzymatischen Aktivität der GST mit der Konzentration von $\alpha$ -GST im Serum .....	38
3.2. Vergleich der Volumenersatzlösungen .....	39
3.2.1. Die GST-Aktivität im Serum.....	39
3.2.2. Die AST-Aktivität im Serum .....	41
3.2.3. Die ALT-Aktivität im Serum .....	43
3.2.4. Die Lebersyntheseparameter Albumin/Gesamteiweiß und Cholinesterase.....	45
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1. Die Lebertransplantation am Schwein .....	48
4.2. Bypassverfahren.....	48
4.3. Beobachtungszeitraum .....	49
4.4. GST-Enzymaktivität und $\alpha$ -GST-Enzymkonzentration im Serum .....	50
4.5. GST als valider Parameter für hepatozelluläre Schädigung .....	50
4.6. Vergleich der Volumenersatzlösungen .....	55
4.7. Schlußfolgerung .....	64
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Abkürzungen .....</b>	<b>97</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>98</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>99</b>
<b>10. Veröffentlichungen.....</b>	<b>100</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Der Ischämie- und Reperfusionsschaden bei Lebertransplantation

Die Lebertransplantation hat in den letzten zwanzig Jahren immer größere Fortschritte gemacht und ist heute die Therapie der Wahl für Lebererkrankungen im Endstadium. Dennoch stellen schlechte Primärfunktion, Infektion und Abstoßung immer noch große Probleme dar und sind die Hauptursachen für eine Mortalitätsrate von 15-25 % in den ersten beiden Jahren nach der Transplantation (Angus et al. 2000, Edwards et al. 1999, First 1992, Otte 1991, Bismuth et al. 1987).

Jede Leber wird im Verlauf der Transplantation zwangsläufig zu einem gewissen Grad geschädigt. Manche Lebern jedoch so schwer, daß sie versagen und eine sofortige Retransplantation erforderlich wird (primäre Nichtfunktion). Andere funktionieren so schlecht, daß eine längere Behandlung der Patienten auf der Intensivstation nötig wird (primäre Dysfunktion).

Durch die stetige Entwicklung und Verbesserung der Konservierungslösungen konnte der Konservierungsschaden herabgesetzt, die Organfunktion nach Transplantation verbessert und die Konservierungsdauer der Leber theoretisch auf bis zu 24 Stunden verlängert werden (Belzer und Southard 1988, Momii und Koga 1990). Der Konservierungsschaden ist aber immer noch ein ernstes Problem. Eine primäre Nichtfunktion trat in Studien von Moreno-Sanz et al. (Moreno-Sanz et al. 1999) und Porte et al. (Porte et al. 1998) in 8,4 bzw. 7,8 % der Fälle auf und ist eine Hauptursache für das Nichtüberleben des Empfängers (Todo et al. 1989, D'Alessandro et al. 1991, Furukawa et al. 1991). Außerdem ist klinisch nachgewiesen, daß es bei einer schweren Konservierungsschädigung zu stärkeren Abstoßungsreaktionen des Empfängers auf das Transplantat kommt (Szabo und Heemann 1998, Lowes et al. 1993, Howard et al. 1990).

Um der primären Nichtfunktion und Dysfunktion vorzubeugen, ist es wichtig, die Mechanismen zu kennen, die während der Konservierung und der Reperfusion zur Leberzellschädigung führen. Man unterscheidet vier Komponenten der Schädigung, nämlich die Schädigung im Spenderorganismus vor der Entnah-

me, die Schädigung während der kalten und während der warmen Ischämie und den Reperfusionsschaden. Gegenstand unserer Studie sind die drei letztgenannten Komponenten; diese sind miteinander verknüpft und können unter dem Begriff „Ischämie- und Reperfusionsschaden“ zusammengefaßt werden. Zu einer Schädigung des Organs kommt es bereits bei der Perfusion. Konservierungslösung dringt aus den Blutgefäßen ins Interstitium ein und bildet ein extrazelluläres Ödem. Dadurch werden die Leberkapillaren zusammengedrückt, was zu einer Verschlechterung der Perfusion der Leber führt. Das extrazelluläre Ödem wird bei der Reperfusion durch eindringendes Wasser verstärkt und beeinträchtigt dann auch die gleichmäßige Wiederdurchblutung (Belzer und Southard 1988, Schlumpf 1996).

Durch die Unterbrechung der Blutzufuhr (Ischämie) und damit der Sauerstoffzufuhr tritt während der Perfusion innerhalb kürzester Zeit eine Hypoxie der Leber ein. Die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung im Zytosystem der Mitochondrien ist nicht mehr möglich, noch vorhandenes ATP ist schnell aufgebraucht. Somit fehlt den ATP-abhängigen Ionenpumpen in der Zellmembran ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe,  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe) die Energie. Sie werden in ihrer Aktivität gehemmt, was durch die Hypothermie zusätzlich verstärkt wird (Clavien et al. 1992, Raison 1973). Es kommt zu einer intrazellulären  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation und somit zu einer Senkung des Membranpotentials (Gasbarrini et al. 1992). Als Folge davon gelangen  $\text{Cl}^-$ -Ionen zusammen mit Wasser entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle und verursachen dadurch ein Zellödem (Belzer und Southard 1988, Leaf 1956, Hansen et al. 1994).

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation, die ihrerseits durch Azidose nochmals verstärkt wird, führt auf verschiedenen Wegen, zum Beispiel durch die Aktivierung hydrolysierender Enzyme wie Phospholipasen und Proteasen, zur Schädigung des Organs (Schanne et al. 1979, Cheung et al. 1986, Kurokawa und Takagi 1999).

Der durch die Hypoxie entstandene ATP-Mangel führt auch dazu, daß den Zellen zum Zeitpunkt der Reperfusion die Energie zur Reaktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe und anderer energiekonsumierender Leistungen fehlt.

Während der Hypoxie kommt es vor allem durch die Laktatakkumulation bei der anaeroben Glykolyse und die  $H^+$ -Akkumulation durch Nukleotidhydrolyse zur intrazellulären Azidose. Die zelluläre Ansäuerung destabilisiert lysosomale Membranen und stört den mitochondrialen pH-Gradienten und führt dadurch zu einer Schädigung der Zelle (Woods und Krebs 1971, Belzer und Southard 1988), welche sich durch die Bildung von Ausstülpungen („Blebs“) auf der Zelloberfläche zeigt. Diese stehen in direktem Zusammenhang mit einem Aufbrechen des Zytoskeletts und führen zur irreversiblen Zellschädigung und schließlich zum Zelltod (Lemasters et al. 1983, Lemasters et al. 1987). Eine milde Azidose (pH 7,1-7,2) scheint jedoch unschädlich, ja sogar von positiver Wirkung auf die Organviabilität zu sein (Bonventre und Cheung 1985, Currin et al. 1991). Während der Reperfusion kommt es zur Freisetzung von  $O_2$ -Radikalen (Bzeizi et al. 1997, Adkison et al. 1986). Dies ist vornehmlich bedingt durch die schnelle Degradierung von ATP während der Ischämie, wodurch es zur Akkumulation von Hypoxanthin kommt. Die Xanthin-Dehydrogenase wird in der Ischämiephase durch proteolytische Enzyme zur Xanthin-Oxidase konvertiert (Stirpe und Della Corte 1969, Marzi et al. 1989, Engerson et al. 1987, Yokoyama et al. 1990). Während der Reperfusion entstehen nun bei der Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure freie  $O_2$ -Radikale. Diese greifen mitochondriale und zelluläre Membranen an und führen zur Schädigung von Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen (Pardini 1995, Kurokawa und Takagi 1999, Adkison et al. 1986, McCord 1985, DelMaestro 1980). Kupffer Zellen werden durch sie aktiviert, die ihrerseits Entzündungsmediatoren wie Zytokine und freie  $O_2$ -Radikale ausschütten (Shiratori et al. 1994, Jaeschke und Farhood 1991). Des Weiteren führen sie zur Aktivierung und Infiltration von Leukozyten, vornehmlich polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, aber auch Lymphozyten (Koo und Komatsu 1991, Grisham et al. 1986). Die aktivierten Leukozyten binden an die Endothelzellen und sammeln sich in den Lebersinusoiden an (Takei et al. 1991, Kurokawa et al. 1996, Vollmar et al. 1996 b)). Untersuchungen haben gezeigt, daß durch den Ischämie- und Reperfusionsschaden an der Oberfläche der Endothelzellen verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimiert werden, an welche die Leukozyten adhären (Kees et al. 2000, Granger

et al. 1989, Steinhoff et al. 1990). Dies wird durch gleichzeitig in Endothelzellen und Monozyten gebildete Mediatoren wie der Tumor-Nekrose Faktor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukine und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) verstärkt (Zhou et al. 1992, Le Moine et al. 1997, Pober 1998). Die Leukozyten setzen ihrerseits ebenfalls toxische Metabolite wie O<sub>2</sub>-Radikale und Mediatoren frei, die so zur Schädigung des Organs beitragen (Jaeschke et al. 1996, Arndt et al. 1991, Anderson et al. 1991, Hernandez et al. 1987, Jaeschke et al. 1990, Takei et al. 1991, Varani et al. 1989). Die Leukozytenakkumulation in den Sinusoiden schränkt die hepatische Mikrozirkulation erheblich ein, was durch eine gleichzeitig stattfindende Thrombozytenadhäsion verstärkt wird (Clavien et al. 1992, Clemens et al. 1997, Koo et al. 1992).

Die sinusoidalen Randzellen und hier insbesondere die Endothelzellen stellen ein sehr vulnerables System dar, das neben ischämischen auch unmittelbar mechanischen Einwirkungen, zum Beispiel dem Perfusionsdruck, ausgesetzt ist. Der Parenchymzellschaden ist zum großen Teil auch eine Folge dieser Sinusoidalschädigung (Caldwell-Kenkel et al. 1987, Clavien et al. 1992, McKeown et al. 1988, Clavien 1998).

Die aufgeführten Schädigungen werden hervorgerufen durch den Zustand der zunächst kalten und dann warmen Ischämie und der konsekutiven Reperfusion, wobei der Grad der Schädigung abhängig ist von der Dauer der Ischämiezeit (Clavien et al. 1992, Klar et al. 1998, Janny et al. 1997). Die in der Ischämiezeit stattfindenden Zellveränderungen führen in der Reperfusionsphase zur Schädigung. Dabei sind unterschiedliche Zellen der Leber unterschiedlich betroffen. So werden die Endothelzellen hauptsächlich während der kalten Ischämie, die Hepatozyten besonders während der warmen Ischämie geschädigt (Schön et al. 1998, Otto et al. 1984, Ikeda et al. 1992).

Die wichtigste Maßnahme zur Minderung des Ischämie- und Reperfusionsschadens und zur Verlängerung der Konservierungsdauer ist die Kühlung des Transplantats in Eiswasser. Bei Normothermie erleidet die Leber schon nach 10-20 Minuten irreversible Schäden infolge des Sauerstoffmangels (Wolff und Otto 1978). Bei einer Abkühlung um 10 °C zeigen die meisten Enzyme eine 1,5-

2-fache Verringerung ihrer Aktivität. Das bedeutet eine Herabsetzung der Stoffwechselaktivität auf ca. ein Zwölftel bei einer Abkühlung auf 1 °C (Belzer und Southard 1988).

Durch den verlangsamten Stoffwechsel können die Auswirkungen der Hypoxie bis zu einem gewissen Grad abgefangen werden: Der ATP-Verbrauch wird gedrosselt, in den Zellen vorhandenes ATP hält länger vor. In einer Studie mit isolierten Hepatozyten fiel der zelluläre ATP-Gehalt um 50 % bzw. 70 % nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden Konservierung in 4 °C kalter Lösung (Sorrentino et al. 1991). Im Zustand der warmen Ischämie zeigte sich ein Abfallen des ATP-Gehalts um 87 % bereits nach 120 Minuten (Kamiike et al. 1988).

Durch die hypotherme Konservierung wird die Degeneration von ATP zu Hypoxanthin und Xanthin verlangsamt. Bei der Wiedererwärmung des Organs durch die Reperfusion entstehen weniger O<sub>2</sub>-Radikale. Dadurch kommt es zu einer geringer ausgeprägten Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion. Ebenso wird die anaerobe Glykolyse und damit die Bildung von Laktat verlangsamt, die Azidose wird gemindert. Dieser Effekt wurde sowohl bei der Reperfusion konservierter Organe als auch in Zellkulturen nachgewiesen (Viebahn et al. 1991). Andererseits verstärkt die Hypothermie die Zellschädigung, indem sie die in der Zellmembran lokalisierten Ionenpumpen zusätzlich verlangsamt und damit die Bildung des intrazellulären Ödems begünstigt (Leaf 1956, Raison 1973).

## **1.2. Volumensubstitution mit hyperton-isoosmotischen Lösungen**

Die frühe Reperfusionsphase bei der Lebertransplantation ist von einer hämodynamischen Instabilität gekennzeichnet, in der oft die rasche Infusion großer Mengen an Volumenlösungen und gegebenenfalls der Einsatz von Katecholaminen notwendig wird. Ziel muß sowohl die Wiederherstellung der Makrohämodynamik, das heißt die Optimierung des globalen Sauerstoffangebots als auch die Verbesserung des regionalen Blutflusses innerhalb der Leber sein.

Wie verschiedene Studien gezeigt haben, führt die intravenöse Bolusapplikation einer kleinen Menge stark hypertoner Kochsalzlösung bei hämorrhagischem

Schock zu einer raschen Verbesserung von Makrohämodynamik, regionalem Blutfluß und Mikrozirkulation (Alemayehu et al. 1996, Matsuoka und Wisner 1996, Vollmar et al. 1994, Maningas 1987). Die günstigsten Kreislaufeffekte bei optimaler Verträglichkeit findet man bei einer Natriumkonzentration von 7,2-7,5 g/l (Rocha e Silva et al. 1990). Der unmittelbare hämodynamische Effekt dieser sogenannten „small-volume resuscitation“ beruht auf der raschen Erhöhung der Plasmaosmolarität, wodurch ein osmotischer Gradient an den Zellmembranen der Blut- und Endothelzellen, bzw. zwischen Intra- und Extravasalraum aufgebaut wird.

Durch entsprechende Zugabe von Hydroxyäthylstärke würde eine Lösung hypertotonisch. Der intravasale kolloid-osmotische Druck würde erhöht, die kardiovaskuläre Wirkung dadurch verstärkt und verlängert und die Mikrozirkulation verbessert (Kreimeier und Messmer 2002).

Der wesentliche Wirkmechanismus der hypertonen Lösung ist die Mobilisierung bzw. Verschiebung körpereigener Flüssigkeiten in den Intravasalraum und damit die Expansion des Plasmavolumens (Moon et al. 1996, Mazzoni et al. 1988) weit über das Volumen der infundierten Lösung hinaus. Die Flüssigkeitsextraktion aus den Kapillarendothelien führt zu einer Abnahme der Endothelzellschwellung, also zur Reduktion des hydraulischen Widerstandes und damit zu einer Verbesserung des mikrozirkulatorischen Blutflusses (Mazzoni et al. 1988, Corso et al. 1998, Vollmar et al. 1996 a), Kreimeier und Messmer 2002). Mit der Plasmaexpansion ist eine Hämodilution verbunden, die die rheologischen Eigenschaften des Blutes verbessert (Messmer und Kreimeier 1989). Es kommt zu einer Homogenisierung der Kapillardurchblutung. Außerdem reduzieren hypertone Lösungen die postischämische Leukozytenadhärenz am Endothel postkapillärer Venolen (Corso et al. 1999, Vollmar et al. 1996 a)) und stellen die Vasomotion im Kapillarbereich wieder her (Messmer und Kreimeier 1989). Durch die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirken sie ferner eine Vasodilatation (Lundvall et al. 1969, Lutt et al. 1977). Dadurch sinkt der vaskuläre Widerstand, und der regionale Blutfluß zu vitalen Organen nimmt zu (Alemayehu et al. 1996, Kien et al. 1996).

### 1.3. Diaspirin Crosslinked Hemoglobin — DCLHb

DCLHb (Baxter Healthcare Corporation) ist eine stromafreie, chemisch modifizierte humane Hämoglobinlösung mit sauerstofftransportierenden Eigenschaften, die aus humanen Erythrozytenkonzentraten gewonnen wird. Stromafreies Hämoglobin zerfällt intravaskulär schnell in seine vier Untereinheiten und hat deswegen eine kurze Halbwertszeit (Bunn et al. 1969). Eine Stabilisierung des Tetramers wird erreicht durch die Reaktion von Hämoglobin mit bis (3, 5 dibromosalicyl)-fumarat. Dabei kommt es zu einer chemischen Vernetzung der beiden  $\alpha$ -Ketten und somit zu einer verlängerten Halbwertszeit des Hämoglobinmoleküls (Snyder et al. 1987, Hess et al. 1989, Chatterjee et al. 1986, Nelson et al. 1992).

Der globale Sauerstofftransport und die Sauerstoffabgabe an das Gewebe durch DCLHb sind vergleichbar mit den Eigenschaften von frischen Erythrozytenkonzentraten. Da die Sauerstoffbindungskurve bei DCLHb gegenüber Vollblut nach rechts verschoben ist ( $p_{50} = 32-36$  mmHg), gibt es leichter Sauerstoff an das Gewebe ab (Baron 1998). Eine 10%ige DCLHb-Lösung ist leicht hyperonkotisch und damit als Volumenersatzmittel geeignet (Reah et al. 1997). Neben seinen sauerstofftransportierenden Eigenschaften hat DCLHb eine ausgeprägte vasokonstriktorische Wirkung in den Arteriolen, die in einem deutlichen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks resultiert (Sharma et al. 1994 b), Reah et al. 1997, Przybelski et al. 1996). Die Vasokonstriktion beruht zum einen darauf, daß DCLHb Stickstoffmonoxid (NO) bindet und inaktiviert, zum anderen auf einer verstärkten Freisetzung von Endothelin aus den Gefäßendothelien (Gulati et al. 1997, Gulati et al. 1995, Schultz et al. 1993). Dadurch bewirkt DCLHb eine verstärkte regionale Perfusion vitaler Organe, wobei anders als bei der Anwendung von Katecholaminen keine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation festgestellt wurde. Eine Erhöhung des Herzzeitvolumens sowie des Schlagvolumens nach DCLHb-Gabe wurde gemessen, eine Veränderung der Herzfrequenz wurde in keiner der genannten Studien beobachtet (Gulati et al. 1994, Sharma und Gulati 1994, Reah et al. 1997).

In einem Ischämie-Reperusionsmodell (Pickelmann et al. 1998) verminderte die Applikation von DCLHb die postischämische Leukozytenadhärenz und die

Extravasation von Makromolekülen. Außerdem förderte sie die Erholung von Kapillaren, wodurch ein dichteres funktionierendes Kapillargeflecht wiederhergestellt wurde, verbesserte das Strömungsverhalten der Erythrozyten und erhöhte den Sauerstoffpartialdruck im Gewebe.

Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, daß DCLHb nach hämorrhagischem Schock die Hämodynamik und die Reperfusion wirksamer verbesserte als die herkömmlichen kristalloiden und kolloidalen Lösungen. Es wurde eine gute Verträglichkeit bei nur vorübergehenden und nicht schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt (Przybelski et al. 1996, Baron et al. 1997, Rhea et al. 1997, Dunlap et al. 1995). Eine neuere Untersuchung hat jedoch bei Patienten, die nach hämorrhagischem oder septischem Schock mit DCLHb behandelt wurden, eine höhere Morbidität und Mortalität festgestellt als bei Patienten, die mit einer kristalloiden Lösung behandelt wurden (Sloan et al. 1999). In einer weiteren Studie wurden die Überlebenschancen von kritisch kranken Patienten vor der Behandlung mit DCLHb bzw. einer kristalloiden Lösung nach bestimmten Analyseverfahren prognostiziert. Es stellte sich dabei heraus, daß in der DCLHb-Gruppe mehr Patienten, die zuvor als überlebensfähig eingestuft worden waren starben, als in der Kontrollgruppe. Es wurde jedoch nicht analysiert, durch welche Schädigungsmechanismen diese Mortalität entgegen der berechneten Prognose bedingt war (Sloan et al. 2002). Ob und in wie weit die beobachteten Mortalitätsunterschiede auf die Behandlung mit DCLHb zurückzuführen sind, bleibt noch zu untersuchen.

#### **1.4. Glutathion-S-Transferasen**

Glutathion-S-Transferasen (GST) sind dimere Multifunktionsproteine, die einerseits als Entgiftungsenzyme wirken, andererseits als intrazelluläre Transportproteine von hydrophoben Molekülen wie Bilirubin, Steroiden und Gallensäuren. In der Leber sind sie an der Phase-II-Entgiftung beteiligt, indem sie die Konjugation von elektrophilen Giftstoffen an das nukleophile reduzierte Glutathion ( $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Glycin, GSH) katalysieren. Diese GSH-Konjugate werden

entweder zu Merkaptursäure verstoffwechselt oder durch einen ATP-abhängigen Transportmechanismus aus der Zelle transportiert (Boyer 1989, Awasthi et al. 1994).

Die ersten GST wurden in Rattenlebern von Booth et al. 1961 identifiziert (Booth et al. 1961). Bis heute sind über 100 GST-Isoenzyme in verschiedenen Spezies und in verschiedenen Gewebearten bekannt.

Die Bestimmung der GST-Aktivität im Gewebe erfolgt normalerweise nach der Methode von Habig, bei welcher 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol als Substrat verwendet wird, da es die höchste Affinität zum Enzym besitzt (Habig et al. 1974).

GST kommen fast ubiquitär in der Natur vor. Bei Säugern findet sich generell eine hohe Konzentration (in manchen Organen bis zu 10 % der zytosolischen Proteine). Bei anderen Spezies (z. B. Hai) lassen sich dagegen nur niedrige Konzentrationen nachweisen. GST-Aktivität lässt sich in den meisten menschlichen Organen nachweisen, v. a. in Leber, Niere, Erythrozyten, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel, Intestinum, Haut, Leukozyten, Herz – wahrscheinlich enthalten alle Organe GST. Mit einer mikrosomalen Ausnahme sind alle GST im Zytosol lokalisiert (Boyer 1989, Awasthi et al. 1994).

Eine einheitliche Einteilung der vielen verschiedenen Isoenzyme und ihrer interindividuell unterschiedlichen Ausprägung war schwierig. Mannervik et al. teilten 1985 die GST nach ihren immunologischen, strukturellen und kinetischen Eigenschaften in drei Hauptgruppen ein:  $\alpha$ -,  $\mu$ - und  $\pi$ -GST. Die meisten kationischen Formen gehören zur  $\alpha$ -Klasse, die Formen mit intermediären pI-Werten zur  $\mu$ -Klasse, die meisten anionischen Formen zur  $\pi$ -Klasse. Diese drei Klassen umfassen über 90 % der GST-Proteine. Die restlichen knapp 10 % finden sich nur in geringer Konzentration in wenigen Organen. Die GST der gleichen Hauptgruppe weisen auch bei verschiedenen Spezies viele Gemeinsamkeiten auf. Die Hybridisierung von Untereinheiten zu aktiven Dimeren findet nur innerhalb einer Klasse statt (Mannervik et al. 1985).

Alle drei Klassen sind in unterschiedlichen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden, wobei für die jeweiligen Organe verschiedene Isoen-

zymmuster existieren (gewebsspezifische Ausprägung), so finden sich zum Beispiel in der Niere acht und in der Lunge mindestens drei verschiedene GST-Isoenzyme der  $\alpha$ -Klasse. Interindividuelle Schwankungen sind groß und wahrscheinlich genetisch bedingt. Generell finden sich in Leber und Niere des Menschen vor allem  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST-Formen, wobei die  $\alpha$ -GST-Formen den Hauptteil ausmachen. Diese beiden GST-Formen finden sich auch in anderen Organen. In Lunge und Gehirn machen die  $\pi$ -GST-Formen den Hauptteil aus, im Skelettmuskel finden sich  $\mu$ -GST-Formen, aber keine  $\alpha$ -GST-Formen (Boyer 1989, Awasthi et al. 1994).

### 1.5. Alpha-Glutathion-S-Transferase

Herkömmlich wird das Ausmaß des Ischämie- und Reperfusionsschadens durch die Bestimmung der Serumkonzentrationen der leberspezifischen Enzyme ALT (Alaninaminotransferase), AST (Aspartataminotransferase) sowie GLDH (Glutamatdehydrogenase) und LDH (Laktatdehydrogenase) erfaßt (Hell et al. 1972, Rosen et al. 1998).

Seit einiger Zeit gibt es Untersuchungen über  $\alpha$ -GST als Indikator bei verschiedenen Arten von Leberzellschädigungen. So wurde zum Beispiel ein Ansteigen der  $\alpha$ -GST Serumkonzentration bei chronischer Hepatitis (Nelson et al. 1995, Hayes et al. 1988), bei Leberzellschädigung durch Paracetamolüberdosierung (Beckett et al. 1985), durch hämorrhagischen Schockzustand (Redl et al. 1995) oder bei Leberzellschädigung durch Neugeborenenasphyxie (Beckett et al. 1989) oder Sepsis (Koo et al. 2002) beschrieben. Aus den Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß  $\alpha$ -GST ein sehr guter Indikator für Leberzellschädigung ist, vor allem im Vergleich zu den Transaminasen AST und ALT, die in diesen Studien häufig unbefriedigende Ergebnisse zeigten.

Alpha-GST bietet sich schon durch ihre hohe Konzentration im Zytosol der Hepatozyten (ca. 4-5 % des gesamten Leberproteins; Hiley et al. 1988, Hayes et al. 1991) für Untersuchungen der Leber an. Beim gesunden Menschen beträgt

die Serumkonzentration 0,7-14  $\mu\text{g/l}$  (Platz et al. 1999). Darüber hinaus ist sie den herkömmlichen Parametern wie AST und ALT durch folgende Eigenschaften überlegen:

Während sich AST und ALT fast nur periportal finden, läßt sich  $\alpha$ -GST sowohl periportal als auch perizentral nachweisen (Rappaport 1980, Hiley et al. 1988). Bei dieser homogenen Verteilung im gesamten Leberläppchen zeigt  $\alpha$ -GST durch den Anstieg ihrer Serumkonzentration also eine zentrilobuläre Nekrose früher und deutlicher an als die herkömmlichen Parameter ALT und AST (Schön et al. 1997). Da die perizentralen Hepatozyten empfindlicher auf hypoxische Zustände reagieren als die periportalen und somit zuerst von einer Schädigung betroffen sind (Schön et al. 1997, Redl et al. 1995) ist die Messung von  $\alpha$ -GST in diesem Zusammenhang sehr sinnvoll. Es ist jedoch festzuhalten, daß sich die homogene Verteilung der  $\alpha$ -GST auf die Hepatozyten beschränkt. In den Zellen der intrahepatischen Gallengänge finden sich Glutathion-S-Transferasen der  $\pi$ -Gruppe (Platz et al. 1997, Campbell et al. 1991). Ein weiterer Vorteil der  $\alpha$ -GST ist ein relativ geringes Molekulargewicht von ca. 50 kDa, gegenüber ca. 95 kDa bei der AST, was die Permeabilität durch die Membranen erleichtert. Dies erklärt möglicherweise das relativ schnelle Ansteigen ihrer Serumkonzentration, welches Leberzellschädigungen rascher erkennen läßt, als die langsamer ansteigenden Transaminasen AST und ALT (Schön et al. 1997, Trull et al. 1994, Tiainen et al. 1996, Diaz et al. 1995).

Alpha-GST hat eine wesentlich kürzere Plasmahalbwertszeit (weniger als 90 Minuten) als AST (17 Stunden) und ALT (47 Stunden) oder LDH (113 Stunden) (Schön et al. 1997, Tiainen et al. 1996). Trull et al. stellten sogar eine Plasmahalbwertszeit von weniger als 60 Minuten fest (Trull et al. 1994). Aufgrund der kürzeren Halbwertszeit normalisieren sich die Werte der Serumkonzentration nach hepatozellulärer Schädigung schneller als bei den obengenannten Enzymen mit längeren Halbwertszeiten und zeigen so die Erholung der Hepatozyten rascher an (Diaz et al. 1995, Matsumoto et al. 2000).

Verschiedene Studien haben gezeigt, daß auch der Anstieg der Serumkonzentration schneller und stetiger ist, als bei herkömmlichen Leberfunktionstests (Busch et al. 2000, Schön et al. 1997, Trull et al. 1994, Tiainen et al. 1996, Van

Wagensveld et al. 1997, Diaz et al. 1995). Nach Lebertransplantationen mit unkompliziertem postoperativem Verlauf normalisiert sich die Serumkonzentration der  $\alpha$ -GST bereits innerhalb von 48-72 Stunden (Schenk et al. 2000, Platz et al. 1999), während sich die herkömmlichen Parameter wie AST und ALT erst nach Tagen bis Wochen normalisieren.

Der schnelle Anstieg und der schnelle Rückgang der  $\alpha$ -GST Serumkonzentration machen es möglich, kurzfristige Änderungen im Sinne von Verbesserung oder Verschlechterung des Leberzustandes zu erkennen und auf mögliche Ursachen zurückzuführen. Ein Wiederanstieg nach Normalisierung läßt eine erneute hepatozelluläre Schädigung erkennen und macht rechtzeitige therapeutische Maßnahmen möglich (Platz et al. 1999, Tiainen et al. 1996), während die längerfristig erhöhten AST- und ALT-Werte eine erneute Schädigung nicht oder nur gering und später anzeigen. Eine eventuelle Therapie der postoperativen Schädigung läßt sich ebenfalls anhand des Verlaufs der  $\alpha$ -GST Werte rasch beurteilen: Die erfolgreiche Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation mit Steroiden kann zum Beispiel durch das prompte Abfallen der  $\alpha$ -GST Serumkonzentration viel schneller und genauer beurteilt werden, als mit den längerzeitig erhöhten Transaminasen AST und ALT (Platz et al. 1997, Platz et al. 1999, Dickson et al. 1999, Trull et al. 1994). Außerdem kann durch die  $\alpha$ -GST Serumkonzentration zwischen steroid-sensitiver und steroid-resistenter Abstoßungsart unterschieden werden. Dadurch kann die Abstoßungstherapie genauer dem Bedarf angepaßt, das heißt es kann eine unnötig überhöhte Immunsuppression vermieden werden und das Risiko opportunistischer Infektionen und anderer schwerer Nebenwirkungen dadurch erheblich gemindert werden (Platz et al. 1997, Platz et al. 1999, Trull et al. 1994). Bei Abstoßungsreaktionen zeigt sich ein klarer Anstieg der Serumkonzentration von  $\alpha$ -GST (Dickson et al. 1999, Diaz et al. 1995). In einer Studie konnte ein Anstieg von über 50 % beobachtet werden (Trull et al. 1994). Jedoch ist  $\alpha$ -GST kein spezifischer Indikator für Abstoßungsreaktionen, sondern für jegliche Art der hepatozellulären Schädigung (Nagral et al. 1998, Hughes et al. 1997). Aufgrund der erwähnten Eigenschaften der  $\alpha$ -GST, wie die gleichmäßige Verteilung in der Leber, die hohe Konzentration im Zytosol, die kurze Halbwertszeit

und das geringe Molekulargewicht, scheint  $\alpha$ -GST ein wertvolles Enzym bei der Bestimmung des Ischämie- und Reperfusionsschadens zu sein.

### 1.6. Fragestellung

In der vorliegenden Studie soll die Aussagekraft der  $\alpha$ -GST als Indikator des hepatischen Ischämie- und Reperfusionsschadens in einem Akutmodell der orthotopen Schweinelebertransplantation untersucht werden. Es werden in dieser Versuchsanordnung drei verschiedene Reperusionsstrategien untersucht und die Aussagekraft der  $\alpha$ -GST mit der Aussagekraft der herkömmlichen Parameter AST und ALT verglichen.

Die drei Reperusionsstrategien involvieren die Applikation von Diaspirin-Crosslinked Hemoglobin (DCLHb) in der frühen Reperusionsphase bei der einen Gruppe, einer hyperten-isoosmotischen Lösung (Hyperhes, HHES) bei der zweiten Gruppe und einer isoton-isoosmotischen Lösung (HAES-steril) bei der Kontrollgruppe.

Durch die Vergleiche soll zum einen ein möglichst genaues und differenziertes Bild davon gewonnen werden, wie  $\alpha$ -GST das Ausmaß der Leberschädigung anzeigt, zum anderen können Aufschlüsse darüber erwartet werden, wie die verglichenen Reperusionsstrategien das Ausmaß der Leberschädigung beeinflussen.

Die Hypothesen sind zum einen, daß  $\alpha$ -GST der sensitivere und genauere Marker für die Leberzellschädigung bei Lebertransplantation ist, zum anderen, daß die Applikation von DCLHb und HHES den globalen Blutfluß zur Leber steigert, die intrahepatische Verteilung desselben verbessert und zu einer besseren Gewebeoxygenierung und einer stabileren Hämodynamik während der Reperfusion führt und damit insgesamt den Ischämie- und Reperfusionsschaden mindert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Für die vorliegende Versuchsreihe wurden 68 Schweine (Deutsches Haus-schwein) verwendet. Das Tiergewicht lag zwischen 30 und 34 kg. 34 Transplan-tationen wurden durchgeführt, dabei wurde jeweils in der gleichen Zuchtlinie transplantiert.

Dieser Tierversuch wurde der Tierschutzkommission beim Regierungspräsi-den-ten in Tübingen vorgelegt und genehmigt.

### 2.2. Konservierungslösung

Bei allen Transplantationen wurde die von Bretschneider entwickelte Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat Lösung (HTK) (Custodiol, Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein) verwendet.

### 2.3. Zusammensetzung der Volumenersatzlösungen

Als Volumenersatzlösungen (**Tab. 2. 1.**) wurden eine stromafreie chemisch mo-difizierte humane Hämoglobinlösung (Diaspirin-Crosslinked Hemoglobin / DCLHb, Baxter Healthcare Corporation) und eine hyperten-isonkotische Lö-sung (Hyperhes, d. h. 6 % Hydroxyäthylstärke 200.000/0,5 in 7,2%iger NaCl-Lösung / HHES, Fresenius GmbH) verwendet. Eine isoton-isonkotische Lö-sung (d. h. 6 % Hydroxyäthylstärke 200.000/0,5 in 0,9%iger NaCl-Lösung / HAES-steril, Fresenius GmbH) wurde als Kontrollösung eingesetzt.

**Tabelle 2. 1.:** Zusammensetzung der Volumenersatzlösungen

Volumenersatzlösung	NaCl (g/l)	Na <sup>+</sup> (mmol/l)	Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	Osmolarität (mosm/l)	Hdroxyäthylstärke (g/l)	KOD (mmHg)	p50 (mmHg)
Hyperhes	72,0	1232	1232	2464	60	36	--
DCLHb	8,5	145	145	290	--	48	36
HAES-steril	9,0	154	154	308	60	36	--

Legende: KOD = kolloidosmotischer Druck  
 p50 = Sauerstoffpartialdruck, bei dem eine Sauerstoffsättigung des Hämoglobins von 50 % erreicht wird

## 2.4. Operationsvorbereitung

Die Versuchstiere wurden 24 Stunden vor der Operation bei freier Trinkmenge nüchtern gehalten. Spender und Empfänger waren Geschwistertiere um die postoperative Gefahr der Abstoßung, bzw. deren Auswirkungen auf die Meßergebnisse zu vermindern, obgleich sich gezeigt hat, daß Abstoßungsreaktionen bei Schweinelebertransplantationen in einer milden Form verlaufen (Calne et al. 1967 a) und b), Bockhorn et al. 1972, Hell et al. 1971, Oldhafer et al. 1993). Die transplantierten Tiere erhielten keine immunsuppressive Therapie, um deren medikamentöse Einflüsse auf den Reperfusionsschaden auszuschließen (Kawano et al. 1990).

Am Vorabend der Operation erhielten die Tiere 300 mg Ranitidin (Sostril) mit der Nahrung verfüttert.

## 2.5. Anästhesie

Die Tiere erhielten eine Prämedikation mit 0,3-0,5 mg/kg Körpergewicht (KG) Midazolam (Dormicum) i. m., 10-12 mg/kg KG Ketamin (Ketanest) i. m. und 0,02-0,05 mg/kg KG Atropin i. m..

Die Narkoseeinleitung erfolgte über einen peripheren venösen Zugang (Abbocath 20 G) in der Ohrvene mit 1-1,5 mg/kg KG Methohexital (Brevimytal) und ca. 5-10 ml Fentanyl (Fentanyl-Janssen). Nach endotrachealer Intubation wurde die Narkose mit 0,02 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl-Janssen) und 0,4 mg/kg KG Midazolam (Dormicum) fortgeführt. Die Relaxierung erfolgte mit Pancuronium (Pancuronium, 2 ml/h, Dosis nach Bedarf), über einen 50 ml Perfusor. Die Tiere wurden mit einem Tidalvolumen von ca. 10-12 ml/kg KG, gesteuert nach Analyse der Blutgase, bei einer Atemfrequenz von 12-15 /min beatmet (Siemens Servo 900 C).

Das Monitoring erfolgte über einen HP Monitor Merlin mit angeschlossenem MARS Überwachungssystem und Drucker.

Bei Bedarf wurden die üblichen Notfallmedikamente gegeben (Adrenalin, Noradrenalin, Xylocain, Dopamin, Dobutamin und Natrium-Bikarbonat). Die Volumengabe mit Elektrolytgrundlösung und HAES-steril 6 % orientierte sich am Blutverlust; Vollblut vom Spendertier wurde dem Empfängertier nach Bedarf transfundiert.

## 2.6. Spenderoperation

Die Operationstechnik entspricht weitgehend der von Calne (Calne et al. 1967 a) und b)), soll jedoch mit ihren Varianten hier aufgeführt werden:

Unter sterilen Bedingungen wurden einseitig die Halsgefäße des Tieres freigelegt. In die rechte Arteria carotis interna wurde ein PVC-Katheter (Abbocath 14 G, mit „Heidelberger Verlängerung“) gelegt. Hierüber erfolgten eine kontinuierliche Blutdruckmessung und die Blutentnahmen für die Laboruntersuchung. In

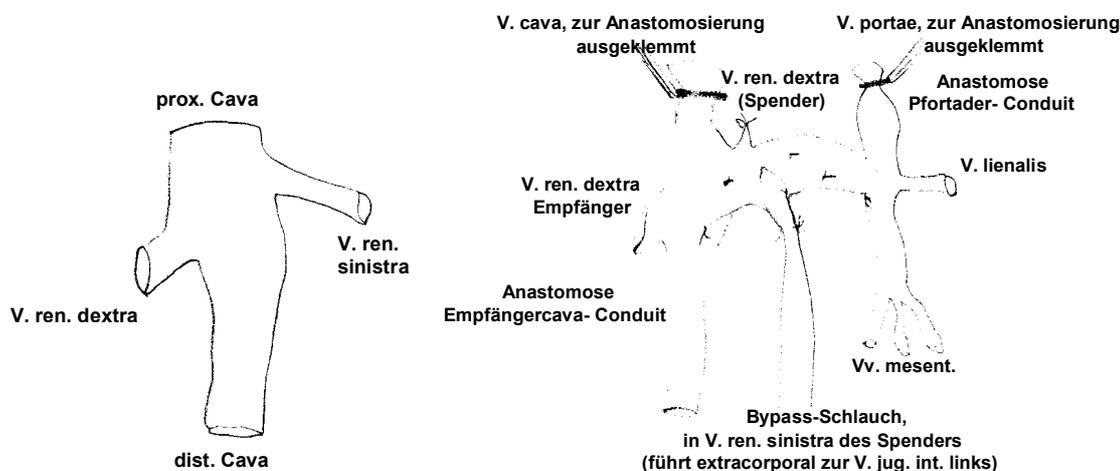
die rechte Vena jugularis interna, bzw. Vena subclavia wurde ein zentralvenöser Katheter (Shaldon-Katheter 12 Fr) gelegt. Kurz vor der medianen Laparotomie wurde Blut für die Laboruntersuchung abgenommen. Nach Einsetzen eines Bauchspreizers erfolgte die Splenektomie und schließlich die Präparation der Leberpforte. Zwei wichtige Gesichtspunkte bei der Explantation sind, die Manipulation der Leber und ihrer zuführenden Gefäße vor der Perfusion so gering wie möglich zu halten und die Gefäße möglichst leberfern zu präparieren. Der im Ligamentum hepatoduodenale gelegene Ductus choledochus wurde duodenalnah freigelegt, ligiert und durchtrennt. Anschließend wurden die Arteria hepatica und Vena portae im Ligamentum aufgesucht, freipräpariert und angeschlossen. Nun wurde eine Kontrollmessung des Leber-pO<sub>2</sub> mit Gewebemikrokathetern, eine Blutentnahme und eine Blutgasanalyse durchgeführt. Die Umstechung der drei Zwerchfellvenen erfolgte nahe an der Einmündung in die suprahepatische Vena cava inferior. Proximal des Truncus coeliacus wurde die Aorta angeschlossen und bei Perfusionsbeginn ligiert, um während der Perfusion einen Abstrom nach kranial zu vermeiden. Für die aortale Perfusion wurde eine Schleuse (8,5 Fr) nach Freilegung in die Aorta eingeführt. Kurz vor der anhepatischen Phase wurde Blut für die Laboruntersuchung abgenommen und dem Tier intravenös Liquemin (Hoffmann La Roche 50 IE/kg KG) zur Vermeidung von intrahepatischen Mikroembolien injiziert. Während der Spenderoperation wurde über den in der Arteria carotis interna liegenden PVC-Katheter Vollblut abgenommen, das in CPDA-Beuteln aufbewahrt wurde und zur späteren Transfusion beim Empfänger diente. Der Vorgang wurde abgeschlossen, bevor die Heparinisierung des Tieres zur Vorbereitung der Organperfusion erfolgte. Die Perfusionsschläuche wurden nun in die Vena portae und in die Aorta eingelegt und befestigt und die simultane Perfusion begonnen. Dabei wurde die supra- und infrahepatische Vena cava inferior zur Entlastung der Leber durchtrennt. Die Perfusion erfolgte mittels Schwerkraft über für die Transplantation übliche großkalibrige Schläuche. Es hat sich erwiesen, daß der arterielle Perfusionsdruck den physiologischen Blutdruck nicht überschreiten sollte. Dieser beträgt in der Arteria hepatica im Mittel 100 mmHg, in der Vena portae 10-12 mmHg. Um einerseits eine mechanische Überbeanspruchung mit folgender

Endothelzellschädigung zu vermeiden, andererseits ein zügiges Freispülen mit rascher Kühlung der Leber zu garantieren, wurden die Perfusionsdrücke entsprechend arteriell auf ca. 120 cm H<sub>2</sub>O und portal-venös auf ca. 30 cm H<sub>2</sub>O festgelegt. Die Perfusionsmenge betrug jeweils ein Liter arteriell und fünf Liter venös. Zum Zeitpunkt der Perfusion hatte die Konservierungslösung eine Temperatur von 4 °Celsius; die Leber wurde zusätzlich in situ durch eiskalte NaCl-Lösung oberflächengekühlt. Am Ende der Perfusion erfolgte die Entnahme des Organs, das dann in eisgekühlter Flüssigkeit weiterpräpariert wurde. Dazu gehörten das Abbinden des Ductus cysticus, das Kürzen der suprahepatischen Vena cava inferior und die Skelettierung der Arteria hepatica und der Vena portae. Anschließend wurde die Leber in sterile Tücher verpackt und bis zur Transplantation in einer Schüssel mit Eiswasser im Kühlhaus bei einer durchschnittlichen Temperatur von 4 °Celsius aufbewahrt.

Es wurde eine Ischämiezeit von 6-6½ Stunden gewählt (im Mittel 6,25 Stunden). Experimentelle Lebertransplantationen am Schwein zeigten, daß Ischämiezeiten in dieser Größenordnung für das Transplantat und seine Funktionsrate optimal sind (Schareck et al. 1991, Klar et al. 1998).

## 2.7. Bypassverfahren

Im Anschluß an die Hepatektomie wurde ein Cava-Conduit vom Spendertier für das Bypassverfahren beim Empfängertier präpariert (**Abb. 2. 1**). Ein Cava-Segment unterhalb der Leber bis oberhalb der Bifurkation einschließlich beider Nierenvenen wurde präpariert, kleine Seitenäste wurden unterbunden. Vor der anhepatischen Phase wurde das Cava-Conduit im Empfänger anastomosiert: Die distale Öffnung wurde end-zu-seit mit der infrahepatischen Vena cava des Empfängers, die proximale Öffnung end-zu-seit mit der Vena portae des Empfängers anastomosiert. In die eine Nierenvene wurde eine ausreichend dicke Venenkanüle einligiert, die das Blut in den Schlauch eines extrakorporalen, in die Vena jugularis führenden Bypass leitete, die andere Nierenvene wurde unterbunden.



**Abbildung 2. 1.:** Bypassverfahren: Cava-Conduit nach Entnahme beim Spender (links) und nach Anlage beim Empfänger (rechts)

## 2.8. Empfängeroperation

Hauptgesichtspunkte der Empfängeroperation waren eine möglichst lebernahe Durchtrennung des Ductus choledochus und der Gefäße und eine sorgfältige Blutstillung in der anhepatischen Phase, die möglichst kurz gehalten werden sollte. Die Gefäße wurden also möglichst spät abgeklemmt.

Zunächst wurden die Halsgefäße freigelegt; in die rechte Vena subclavia wurde ein zentralvenöser Katheter (Shaldon-Katheter) gelegt, in die rechte Vena jugularis interna eine Schleuse (8,5 Fr), über die ein Pulmonalis-Katheter (Swan-Ganz 7,5 Fr) eingeschwenkt wurde. Über die rechte Arteria carotis interna wurde unter Durchleuchtung ein Linksherzkatheter in den linken Ventrikel vorgeschoben; kranial davon wurde ein PVC-Katheter (Abbocath 14/16 G, mit „Heidelberger-Verlängerung“) in die Arterie zur kontinuierlichen Blutdruckmessung und zur Blutabnahme gelegt. In die linke Vena jugularis wurde ein dicklumiger Katheter (30 Fr oder 24 Fr, je nach Gefäßkaliber) als Vorbereitung für den porto-cavo-jugulären Bypass gelegt. Kurz vor der medianen Laparotomie

wurde wie beim Spender an dieser Stelle Blut abgenommen. Nach Eröffnen des Abdomens erfolgte zunächst die Anlage eines suprapubischen Blasenkatheters (Ch 8), zur ständigen Kontrolle der Nierenfunktion, der über eine Tabaksbeutelnaht befestigt wurde. Die Gefäßstrukturen der Leber wurden nun organnah dargestellt (infra- und suprahepatische Vena cava inferior, Ductus choledochus, Arteria hepatica, Vena portae), der Ductus choledochus wurde abgebunden. Zur Aspiration einer Referenzprobe für die Messung des arteriellen Blutflusses in der Leber mit fluoreszierenden Microspheres wurde eine Schleuse (7 Fr) für die Einführung eines Pigtail-Katheters in die Aorta abdominalis gelegt. An dieser Stelle wurde eine Kontrollmessung durchgeführt: neben einer Analyse der Blutgase und einer Blutentnahme für die Laboruntersuchung wurde der Leber- $pO_2$ , der Magen-pH und die Temperatur der Leber gemessen. Der globale hepatische Blutfluß wurde über Ultraschall-Sonden an Arteria hepatica und Vena portae gemessen und es erfolgte eine Injektion von fluoreszierenden Microspheres. Die infrahepatische Vena cava inferior wurde nun für das Bypassverfahren partiell ausgeklemmt um die Anastomose mit dem Cava-Conduit fertigen zu können. Dann wurde die Vena portae partiell ausgeklemmt um hier ebenfalls eine Anastomose mit dem Cava-Conduit fertigen zu können. Der bereits am Cava-Conduit fixierte und der in der Vena jugularis liegende Bypass-Katheter wurden nach entsprechender Entlüftung miteinander konnektiert; der porto-cavo-juguläre Shunt wurde freigegeben.

Arteria hepatica, Vena portae sowie infra- und suprahepatische Vena cava inferior wurden nach Setzen von entsprechenden Gefäßklemmen durchtrennt. Um letztere abzuklemmen zog man das Organ nach kaudal und setzte zwei Cava-Klemmen unter Mitnahme eines schmalen Zwerchfellbereichs, das Gefäß wurde dann unmittelbar an der Leber durchtrennt. Die Empfängerleber wurde aus den Anheftungen im Retroperitoneum gelöst und entfernt.

Nun erfolgte die Implantation der Spenderleber.

Die Anastomosen wurden fortlaufend mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial genäht. Zunächst wurde die suprahepatische Vena cava inferior-Anastomose, dann die infrahepatische Vena cava inferior-Anastomose gefertigt (jeweils mit Ethibond 4,0 doppelt armiert). Es folgte die Anastomose der Vena portae (Pro-

lene 5,0 doppelt armiert) und schließlich die Anastomose der Arteria hepatica (Prolene 5,0 Bv 1). Die obere Cava-Anastomose mußte wegen der schweren späteren Zugängigkeit primär dicht sein; nach Anlegen von Eckfäden erfolgte eine zirkuläre Naht; begonnen wurde mit der Hinterwand, der Zwerchfellrand des Empfängers wurde dabei mitgefaßt. Vor Fertigstellung der Anastomose wurde ein Katheter in eine Lebervene eingeführt, um hierüber während der Reperfusion Perfusat und zu späteren Meßzeitpunkten hepato-venöse Blutgasanalysen abnehmen zu können. Für die Anastomose der Vena portae wurden Spender- und Empfängerpfortader auf erforderliche Länge gekürzt, eine Überlänge mußte vermieden werden, da sonst die Gefahr einer Abknickung und damit einer Blutflußminderung bestand. Nach Fertigstellung aller Anastomosen erfolgte eine Messung der zu bestimmenden Parameter, wie sie bereits vor der Hepatektomie vorgenommen worden war (s. **Abb. 2. 2.**), in der noch anhepatischen Phase. Kurz vor dem Öffnen der Klemmen an Vena portae und Arteria hepatica erfolgte die Bolusinjektion der entsprechenden Volumenersatzlösung (4 ml/kg KG). Es wurde 14 Empfängerschweinen Diaspirin-Crosslinked-Hemoglobin (DCLHb), 10 Empfängerschweinen Hyperhes (HHES) und 10 Empfängerschweinen eine isoton-isoosmotische Kontrollösung (Haes-steril) zentralvenös appliziert. Bei der simultanen Reperfusion über die beiden Gefäße mit Öffnen der zunächst supra- dann infrahepatischen Vena cava inferior-Klemme war es in der frühen Phase wichtig, die Dichtigkeit der Anastomosen zu kontrollieren und den Kreislauf zu stabilisieren (u. a. durch Gabe von Spenderblut und Rückgabe des Blutes aus den Bypassschläuchen über die Vena jugularis externa). Es erfolgte eine Blutentnahme aus der wiederperfundierten Leber über den in der Lebervene liegenden Katheter und anschließend die erste Messung nach Reperfusion. Die Empfängertiere wurden auf dem Operationstisch in Vollnarkose für eine Dauer von sechs Stunden beobachtet. In dieser Zeit erfolgte die Erhebung und Dokumentation der unterschiedlichen Meßparameter, bzw. die Probengewinnung zu festgelegten Zeitpunkten (s. **Abb. 2. 2.**).

Anschließend wurde der Versuch durch Tötung der Tiere mittels Gabe von Pentobarbital (Nembutal) und gesättigter KCl-Lösung in tiefer Narkose beendet.

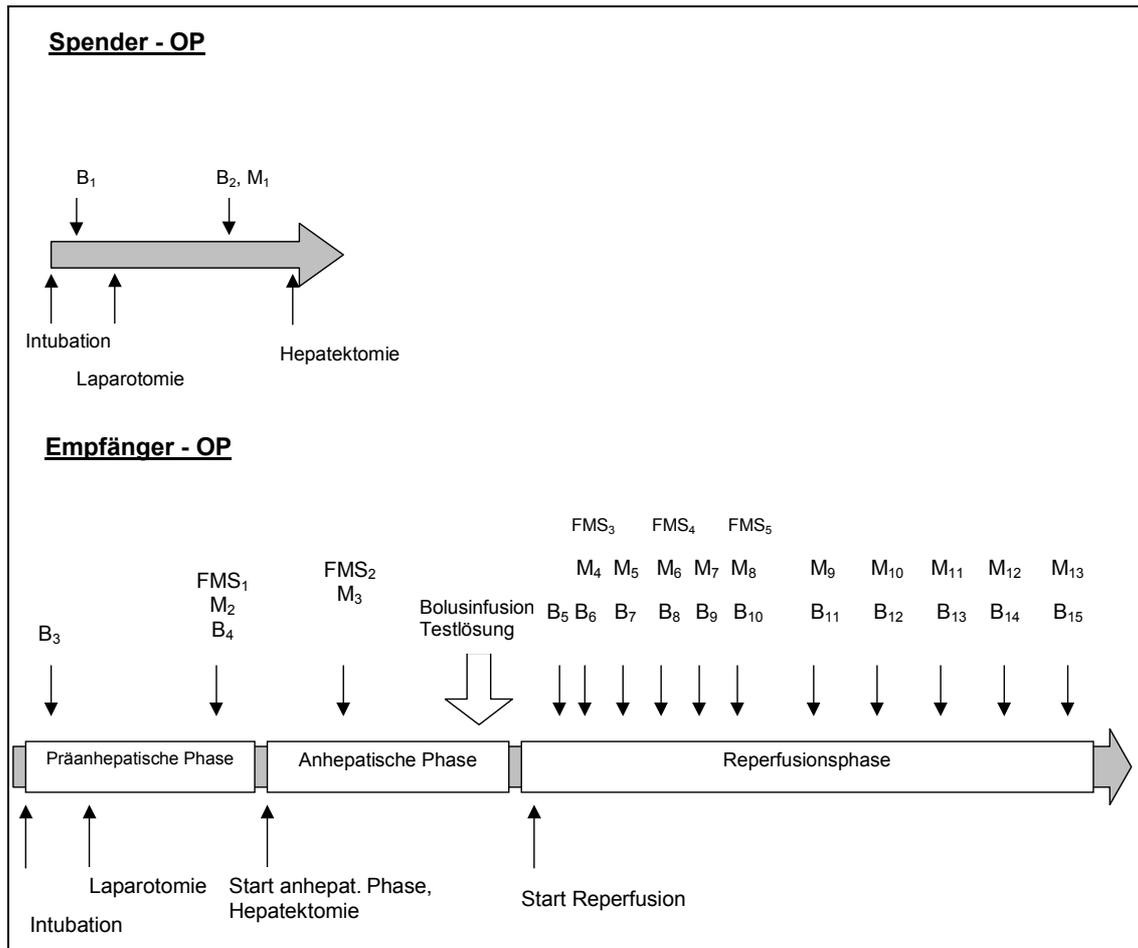
## 2.9. Meßzeitpunkte und Meßparameter

Nach der Narkoseeinleitung und unmittelbar vor der Hepatektomie wurden beim Spender- und Empfängertier Blutproben entnommen. Im weiteren Verlauf wurden beim Empfängertier eine Probe aus dem Perfusat und ab dem Beginn der Reperfusion in festgelegten Zeitabständen Blutproben entnommen.

Aus den Blutproben wurden neben den Transferasen/Transaminasen ( $\alpha$ -GST, AST und ALT) die Enzyme GLDH, LDH und die Lebersyntheseparameter (Gesamteiweiß, Albumin, Cholinesterase) sowie Konjugations- und Exkretionsparameter der Leber (Bilirubin,  $\gamma$ -Glutamyltransferase) bestimmt.

Des weiteren wurden die Elektrolyte bestimmt und ein kleines Blutbild (Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten) erstellt.

Zusätzlich wurden arterielle, gemischtvenöse und hepatovenöse Blutgasanalysen durchgeführt. (s. **Abb. 2. 2.**)



**Abbildung 2.2.:** Meßzeitpunkte im Versuchsablauf

(Kurz vor Beginn der Reperusionsphase wurden 4 ml/kg KG der entsprechenden Volumenersatzlösung als Bolusinfusion zentralvenös appliziert.)

Kurz vor Laparotomie und kurz vor Hepatektomie wurden beim Spendertier ( $B_1, B_2$ ) und beim Empfängertier ( $B_3, B_4$ ) Blutproben entnommen. Im weiteren Verlauf wurde beim Empfängertier unmittelbar nach Reperfusion eine Probe aus dem Perfusat ( $B_5$ ) entnommen, wobei hier das erste Blut abgefangen wurde, das durch die wiederperfundierte Leber floß. Es folgte eine Blutentnahme fünf Minuten nach Reperfusion ( $B_6$ ) und vier Blutentnahmen im Abstand von je 15 Minuten ( $B_7$ - $B_{10}$ ). Bis zum Ende des sechsstündigen Beobachtungszeitraumes wurden weitere fünf Blutproben ( $B_{11}$ - $B_{15}$ ) im Abstand von je 60 Minuten entnommen.

Zu den Meßzeitpunkten  $M_1$ - $M_{13}$  wurden der globale hepatische Blutfluß mit Ultraschallsonden (Flow-Probes), der Leber  $pO_2$  mit Gewebemikrokathetern, der Magen-pHi über eine liegende Magensonde und die Lebertemperatur gemessen. Dabei war  $M_1$  die Kontrollmessung nach Laparotomie beim Spender-,  $M_2$  die Kontrollmessung nach Laparotomie beim Empfängertier.  $M_3$  war die Messung in der anhepatischen Phase und  $M_4$  die Messung fünf Minuten nach Reperfusion und ab dann alle 15, später alle 60 Minuten bis Versuchsende.

Zu den Meßzeitpunkten  $FMS_1$  präanhepatische Phase,  $FMS_2$  anhepatische Phase,  $FMS_3$  5 Minuten nach Reperfusion,  $FMS_4$  35 Minuten nach Reperfusion und  $FMS_5$  65 Minuten nach Reperfusion erfolgte jeweils eine Injektion von fluoreszierenden Microspheres zur späteren Bestimmung des arteriellen Blutflusses in der Leber.

Während der gesamten Operationszeit wurden neben der EKG-Ableitung hämodynamische und Oxygenierungsparameter erfaßt und dokumentiert.

## **2.10. Probenbearbeitung**

Die Blutproben wurden bei Spender- und Empfängertier arteriell entnommen, des weiteren wurde eine gesondert zu betrachtende Blutprobe unmittelbar nach Reperfusion der Leber aus der Lebervene entnommen; es wurde hierbei das erste Blut entnommen, das durch die wiederperfundierte Leber floß.

Die Proben für die  $\alpha$ -GST Bestimmung wurden 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert, 1 ml des überstehenden Serums abgenommen und bis zur Bestimmung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Bestimmung der Routinelaborwerte erfolgte durch das Zentrallabor der Universität Tübingen nach den Vorgaben der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie.

## 2.11. Bestimmung der Glutathion-S-Transferase

### 2.11.2. Bestimmung der Enzymaktivität von GST im Serum

Die Enzymaktivität der GST wurde mit der Methode nach Habig (Habig und Pabst et al. 1974) bestimmt, die auf ein automatisiertes Laborsystem übertragen (Vitalab Eclipse, Merck, Darmstadt) wurde.

Der Reaktionspuffer enthielt 0,1 M Na/K-Phosphat (pH 6,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 4 % Äthanol, 2,5 mM Glutathion und 1 mM 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol. Von den Proben wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  mit je 800  $\mu\text{l}$  des Reagens gemischt, die Inkubationszeit wurde auf 48 Sekunden festgelegt, welcher sich eine Verzögerungszeit von 10 Sekunden und eine kinetische Meßzeit von 20 Sekunden bei 340 nm anschloß. Die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) Konjugat pro Minute bei 25 °C wurde als 1 U festgelegt. Die Hintergrundaktivität von 0,009  $\text{min}^{-1}$  (= 151 U/l in der Probe) wurde automatisch ausgeglichen.

Alle Chemikalien wurden bei Sigma, St. Louis, USA bezogen.

### 2.11.3. Bestimmung der Konzentration von $\alpha$ -GST im Serum

Die Bestimmung der Konzentration der  $\alpha$ -GST erfolgte mittels eines speziell für Schweineplasma ausgerichteten quantitativen Enzymimmunoassays (HEPKIT-Alpha, Biotrin, Dublin, Irland). Auf eine mit Anti- $\alpha$ -GST-Immunglobulin G beschichtete Mikrotiterplatte wurde schrittweise die Probe, Ig G (Anti- $\alpha$ -GST), das Enzymkonjugat und das Substrat zugegeben. Die resultierende Farbintensität war proportional zur vorhandenen Menge von  $\alpha$ -GST in der Probe. Der Meßbereich reichte bis 100  $\mu\text{g/l}$ , durch entsprechende Verdünnung der Proben wurden diese Meßbereiche angepaßt.

### **2.12. Messung des arteriellen Blutflusses in der Leber mit fluoreszierenden Microspheres**

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung der Fluoreszenz der in den linken Ventrikel injizierten Microspheres, die sich von dort im Organismus mit dem arteriellen Blutfluß verteilen.

Bei dieser Methode wurden Microspheres zu den definierten Zeitpunkten in jeweils verschiedener Färbung in den linken Ventrikel injiziert. Von dort verteilen sie sich mit dem arteriellen Blutfluß im Organismus. Nach Versuchsende wurden Proben von Leber, Magen, Herz und Nieren entnommen und im Labor auf ihre Fluoreszenz gemessen. Daraus wurde nach vorgegebener Formel der arterielle Blutfluß errechnet. Der dafür notwendige Referenzwert wurde aus einer Aspirationsprobe aus der Aorta abdominalis berechnet.

### **2.13. Messung des hepatischen Blutflusses mit Ultraschall-Flow-Probes**

Durch Anbringen je einer Ultraschall Flow-Probe an der Arteria hepatica und der Vena portae wurde in der Reperfusionphase zu bestimmten Meßzeitpunkten der Fluß in beiden Gefäßen gemessen und in ml/min angegeben.

(Transonic Systems Flowmeter T206; Fa. Transonic Systems Inc. Ithaca, NY)

### **2.14. Statistik**

Nichtlineare Korrelationen zweier kontinuierlicher Parameter wurden mit dem Rho-Test nach Spearman getestet. Ungepaarte kontinuierliche Parameter in den drei Versuchsgruppen wurden nach Turkey-Kramer getestet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Glutathion-S-Transferase als valider Parameter für das Ausmaß des Ischämie- und Reperfusionsschadens

##### 3.1.1. Verlauf der Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST im Serum ab Beginn der Reperfusion

Der Verlauf der Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST im Serum wurde unter den Bedingungen der drei verschiedenen Reperfusionslösungen (DCLHb, n=14; HHES, n=10; Haes-steril, n=10) beobachtet und verglichen. Es soll Aufschluß darüber gewonnen werden, wie die genannten Enzyme durch ihre Aktivität im Serum jeweils die Schädigungen der Leber bei Ischämie und Reperfusion anzeigen und wie sie sich als Indikatoren für solche Schädigungen eignen.

DCLHb-Gruppe:

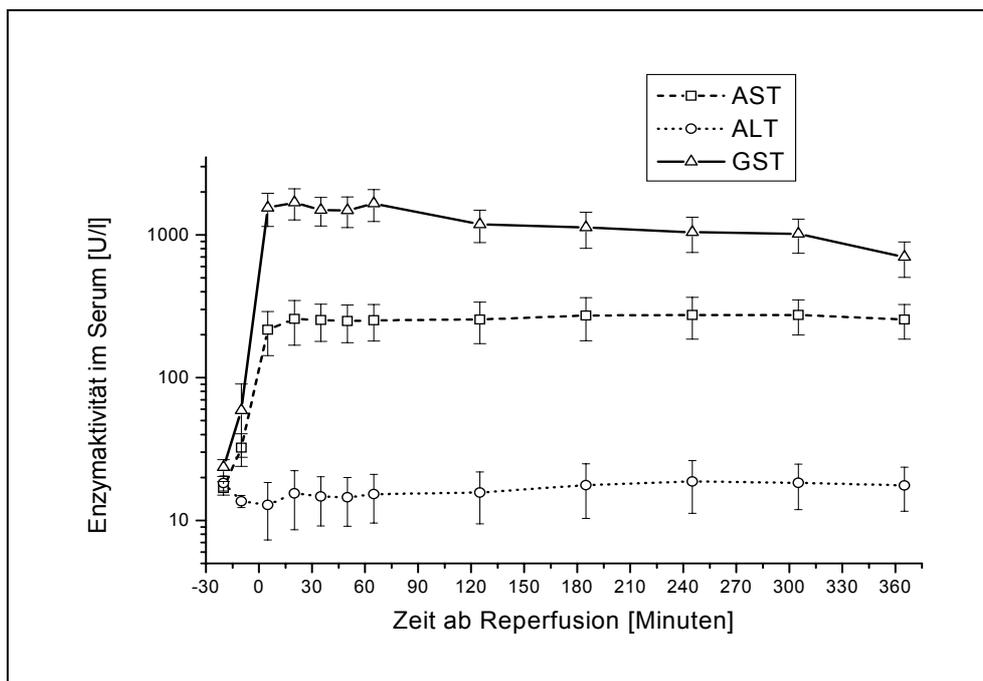
Die Aktivität der ALT im Serum lag ab dem Beginn der Reperfusion zwischen  $13\pm 6$  und  $19\pm 8$  U/l, die Werte blieben im gesamten Beobachtungszeitraum auf niedrigem Niveau annähernd konstant (**Abb. 3. 1.**).

Die AST-Aktivität stieg dagegen in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion von  $32\pm 8$  U/l auf  $216\pm 74$  U/l, d. h. auf das fast 7-fache ihres Ausgangswertes vor Hepatektomie an. Die Werte lagen bis zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Reperfusion zwischen  $250\pm 74$  und  $258\pm 89$  U/l. Vier Stunden nach Reperfusion war die AST-Aktivität bei insgesamt geringem Anstieg und Abfall der Werte auf ihr post-operatives Maximum von  $275\pm 90$  U/l angestiegen. Es folgte ein sehr leichter Abfall der Aktivität um 7 % in den letzten beiden Stunden des Beobachtungszeitraumes auf  $256\pm 70$  U/l.

Die Aktivität der GST im Serum stieg in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion von  $59\pm 31$  U/l auf  $1550\pm 405$  U/l, d. h. auf das ca. 26-fache ihres Ausgangswertes vor Hepatektomie an und zeigte damit einen ca. siebenmal stärkeren Anstieg als die AST-Aktivität im gleichen Zeitraum. Bereits 20 Minuten nach

Reperfusion erreichte die GST-Aktivität ihren post-operativen Maximalwert mit  $1688 \pm 416$  U/l. In den nächsten 30 Minuten fiel sie auf  $1482 \pm 358$  U/l ab. 65 Minuten nach Reperfusion stieg sie wieder auf  $1658 \pm 417$  U/l an und erreichte damit annähernd den Maximalwert. Die Enzymaktivität sank innerhalb von zwei Stunden nach Reperfusion um 28 % auf  $1186 \pm 303$  U/l. Im weiteren Verlauf folgte zunächst ein leichter, dann stärkerer Abfall auf  $699 \pm 193$  U/l am Ende der sechsständigen Beobachtungszeit. Damit lag die Enzymaktivität der GST bei der letzten Messung fast 59 % unter dem post-operativen Maximalwert und war in den letzten fünf Stunden des Beobachtungszeitraumes deutlich zurückgegangen.

Im Vergleich der Enzymaktivitäten zueinander ließ sich feststellen, daß die GST-Aktivität vor Hepatektomie mit  $59 \pm 31$  U/l deutlich über den Werten der Aktivität von AST ( $32 \pm 8$  U/l) und ALT ( $14 \pm 1$  U/l) lag.

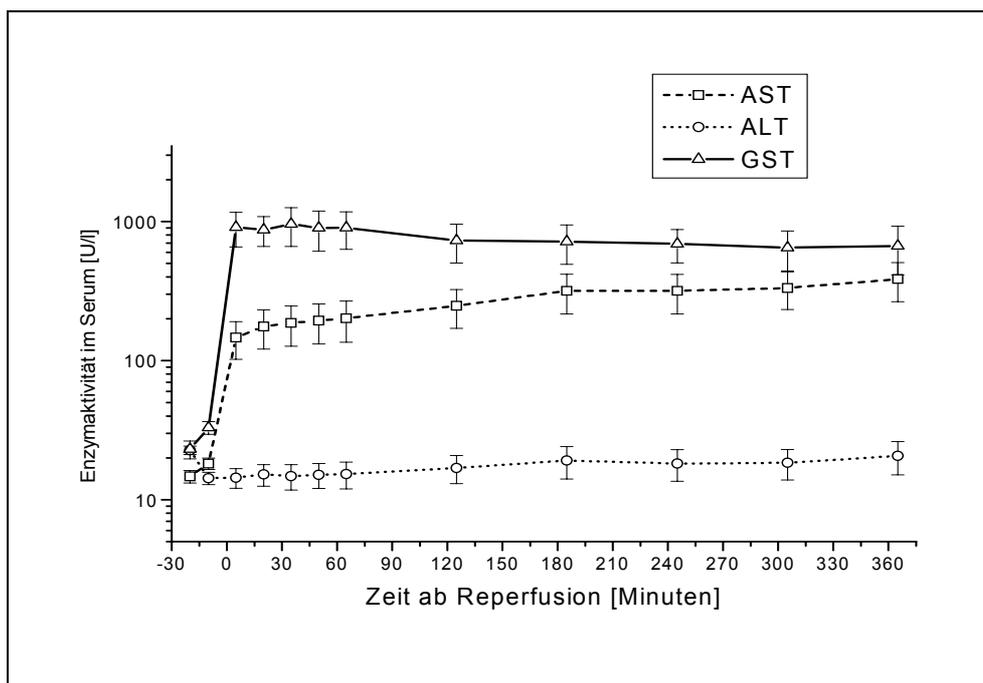


**Abbildung 3. 1.:** Verlauf der Serum-Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST in der DCLHb-Gruppe

## HHES-Gruppe:

Die Aktivität der ALT im Serum lag ab dem Beginn der Reperfusion während des gesamten Beobachtungszeitraumes zwischen  $14\pm 2$  und  $21\pm 6$  U/l (**Abb. 3. 2.**). Vor Hepatektomie lag die Aktivität bei  $14\pm 1$  U/l und zeigte sich fünf Minuten nach Reperfusion unverändert ( $14\pm 2$  U/l).

Die AST-Aktivität stieg dagegen in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion auf das 8-fache ihres Ausgangswertes vor Hepatektomie von  $18\pm 2$  U/l auf  $146\pm 44$  U/l an. Sie stieg danach bis zum Ende des sechsständigen Beobachtungszeitraumes langsam und fast kontinuierlich weiter bis auf  $386\pm 120$  U/l an. Die GST-Aktivität stieg in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion sehr stark von  $33\pm 4$  U/l auf  $911\pm 256$  U/l, d. h. auf fast das 28-fache ihres Ausgangswertes vor Hepatektomie an. Sie erreichte ihren post-operativen Maximalwert 35 Minuten nach Reperfusion mit  $959\pm 296$  U/l und fiel danach bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf  $669\pm 256$  U/l um 30 % ab.



**Abbildung 3. 2.:** Verlauf der Serum-Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST in der HHES-Gruppe

Im Vergleich der Enzymaktivitäten zueinander ließ sich feststellen, daß die Werte vor Hepatektomie mit  $14 \pm 1$  (ALT),  $18 \pm 2$  (AST) und  $33 \pm 4$  (GST) auf vergleichbarem Niveau lagen.

Kontrollgruppe:

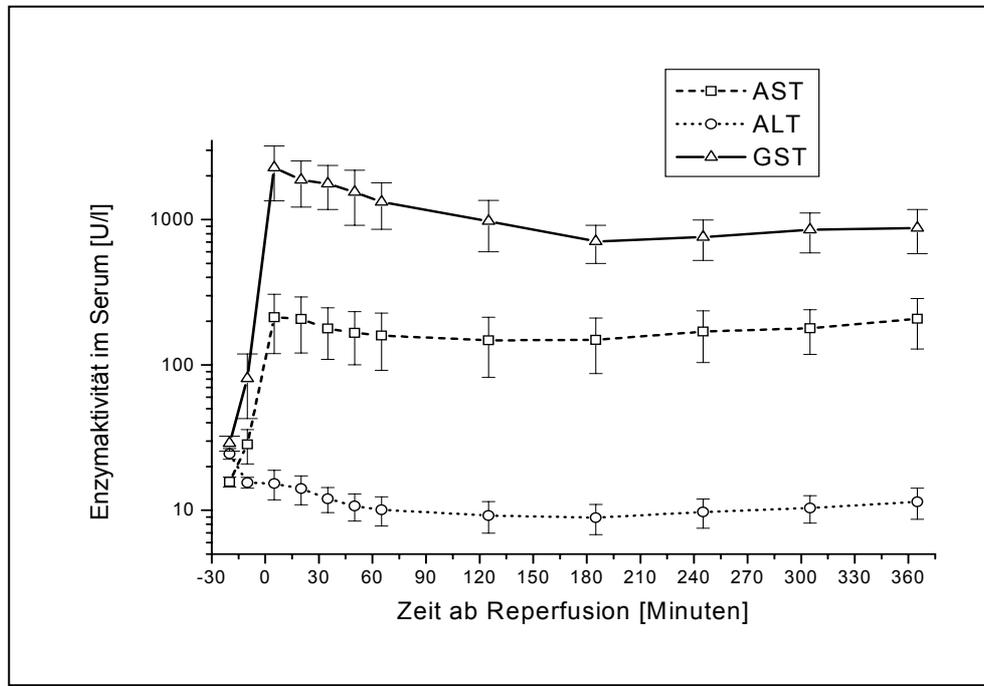
Die Aktivität der ALT im Serum blieb ab dem Beginn der Reperfusion fast unverändert zwischen  $9 \pm 2$  U/l und  $15 \pm 4$  U/l (**Abb. 3. 3.**). Das post-operative Maximum wurde mit  $15 \pm 4$  U/l fünf Minuten nach Reperfusion erreicht, der Ausgangswert vor Hepatektomie lag allerdings bereits bei  $16 \pm 1$  U/l.

Die AST-Aktivität stieg in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion von  $28 \pm 8$  U/l auf  $213 \pm 93$  U/l, d. h. auf das 8-fache ihres Ausgangswertes vor Hepatektomie an und erreichte damit ihren post-operativen Maximalwert. Von diesem fiel sie bis 185 Minuten nach Reperfusion meist geringfügig um insgesamt 30 % auf  $149 \pm 61$  U/l ab. Danach stieg sie bis sechs Stunden nach Reperfusion ebenfalls meist geringfügig wieder auf  $208 \pm 79$  U/l an und erreichte damit nahezu wieder ihren post-operativen Maximalwert.

Die GST-Aktivität erreichte ihren post-operativen Maximalwert fünf Minuten nach Reperfusion mit  $2280 \pm 933$  U/l, dem 28-fachen ihres Ausgangswertes vor Hepatektomie. Danach ging sie bis drei Stunden nach Reperfusion deutlich auf  $707 \pm 207$  U/l zurück, d. h. um 69 % des post-operativen Maximalwertes. Die Aktivität nahm dann wieder leicht zu und erreichte sechs Stunden nach Reperfusion  $877 \pm 295$  U/l.

Im Vergleich der Enzymaktivitäten untereinander lag die GST-Aktivität vor Hepatektomie mit  $81 \pm 38$  U/l deutlich über den Werten der Aktivität von AST mit  $28 \pm 8$  U/l und ALT mit  $16 \pm 1$  U/l. Alle drei Enzymaktivitäten erreichten ihre post-operativen Maximalwerte fünf Minuten nach Reperfusion und gingen dann zurück bis zum Meßzeitpunkt drei Stunden nach Reperfusion. Danach stiegen sie alle wieder an, jedoch nicht in starkem Ausmaß. Im gesamten Verlauf nahm die ALT-Aktivität nur ganz geringfügig ab und zu. Am stärksten war die Zu- und Abnahme bei der GST-Aktivität. Die AST-Aktivität stieg im Vergleich zur ALT-

Aktivität sehr viel stärker, jedoch erheblich weniger als die GST-Aktivität, ging dann aber auch weniger stark zurück als diese.



**Abbildung 3. 3.:** Verlauf der Serum-Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST in der Kontrollgruppe

### 3.1.2. Die Enzymaktivitäten im Spenderorganismus vor Hepatektomie

Die bisherigen Untersuchungen des Verlaufs der Enzymaktivitäten im Serum bezogen sich auf den Empfängerorganismus und umfassen damit Werte der Empfängerleber vor Hepatektomie und der Spenderleber ab dem Beginn der Reperfusion (**Tab. 3. 1. 1.**)

In Tabelle 3. 1. 2. sind die Werte der Spenderleber vor Hepatektomie dargestellt.

Ein Vergleich zeigt, daß die Werte der Empfängerleber vor Hepatektomie mit den Werten der Spenderleber vor Hepatektomie auf vergleichbarem Niveau liegen.

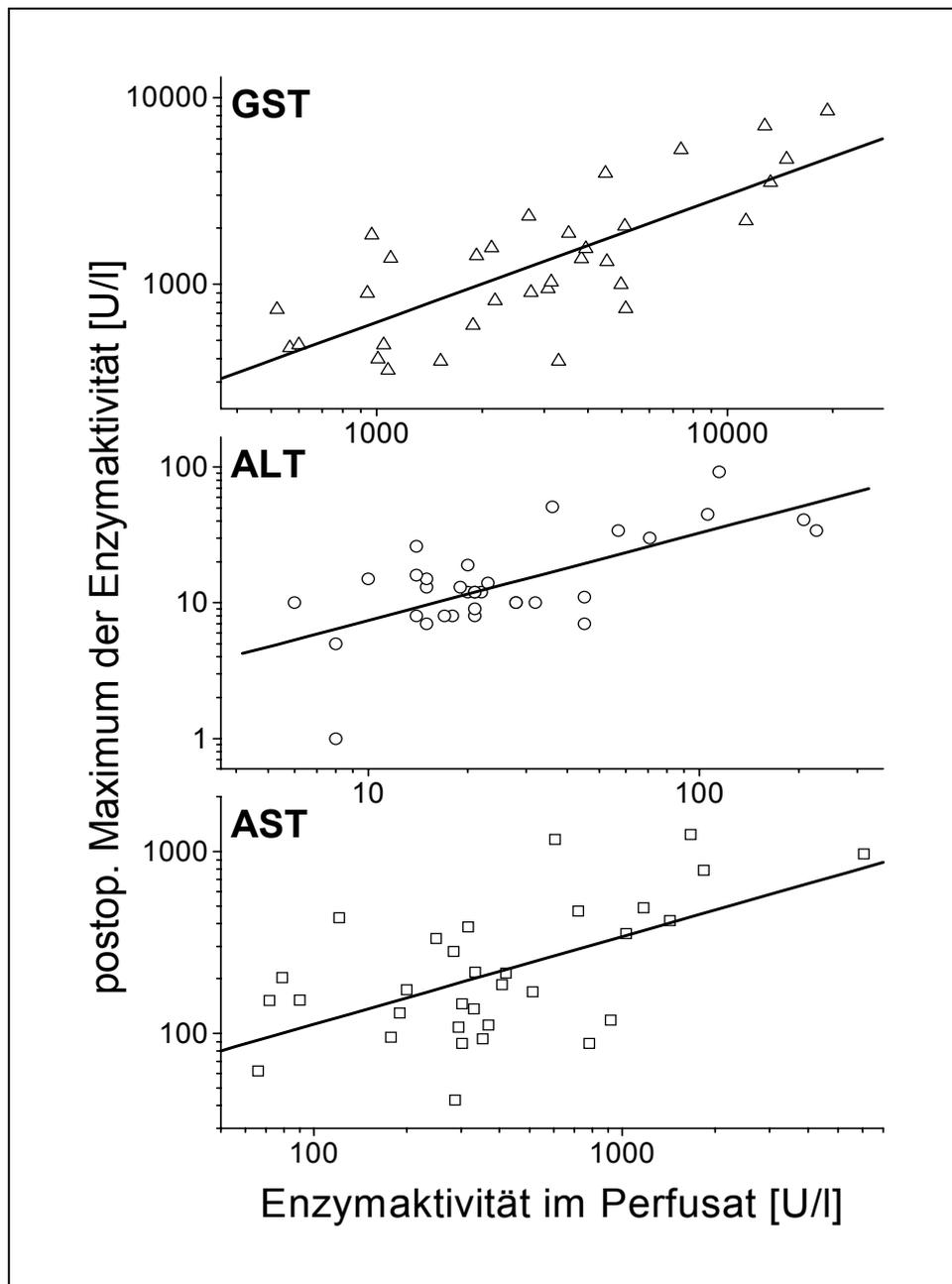
**Tab. 3. 1. 1.:** Enzymaktivität von AST, ALT und GST im Serum (U/l) im Empfängerorganismus (Mittelwert ± Standardfehler)

Zeit [Minuten] (Meßzeitpunkte)		DCLHb-Gruppe			HHES-Gruppe			Kontrollgruppe		
		AST	ALT	GST	AST	ALT	GST	AST	ALT	GST
-20	(B <sub>3</sub> )	17±2	18±2	24±3	15±2	23±2	23±3	16±1	25±2	29±3
-10	(B <sub>4</sub> )	32±8	14±1	59±31	18±2	14±1	33±4	28±8	16±1	81±38
5	(B <sub>6</sub> )	216±74	13±6	1550±405	146±44	14±2	911±256	213±93	15±4	2280±933
20	(B <sub>7</sub> )	258±89	15±7	1688±416	176±55	15±3	872±210	207±86	14±3	1875±656
35	(B <sub>8</sub> )	254±74	15±6	1491±337	187±60	15±3	959±296	178±69	12±2	1767±591
50	(B <sub>9</sub> )	250±74	15±5	1482±358	194±62	15±3	899±289	166±66	11±2	1548±634
65	(B <sub>10</sub> )	253±73	15±6	1658±417	202±66	15±3	903±271	160±68	10±2	1323±465
125	(B <sub>11</sub> )	256±82	16±6	1186±303	248±77	17±4	731±229	147±65	9±2	977±377
185	(B <sub>12</sub> )	272±91	18±7	1124±319	317±101	19±5	719±227	149±61	9±2	707±207
245	(B <sub>13</sub> )	275±90	19±8	1041±289	317±100	18±5	690±185	170±66	10±2	759±234
305	(B <sub>14</sub> )	274±76	18±6	1017±275	333±101	18±5	648±207	179±61	10±2	850±259
365	(B <sub>15</sub> )	256±70	18±6	699±193	386±120	21±6	669±256	208±79	11±3	877±295

**Tab. 3. 1. 2.:** Enzymaktivität von AST, ALT und GST im Serum (U/l) im Spenderorganismus (Mittelwert ± Standardfehler)

Zeit [Minuten] (Meßzeitpunkte)		DCLHb-Gruppe			HHES-Gruppe			Kontrollgruppe		
		AST	ALT	GST	AST	ALT	GST	AST	ALT	GST
-40	(B <sub>1</sub> )	18±3	18±2	24±2	15±1	21±2	31±4	16±1	29±5	31±5
-30	(B <sub>2</sub> )	21±4	12±1	82±17	17±3	13±1	57±15	23±6	19±4	146±69

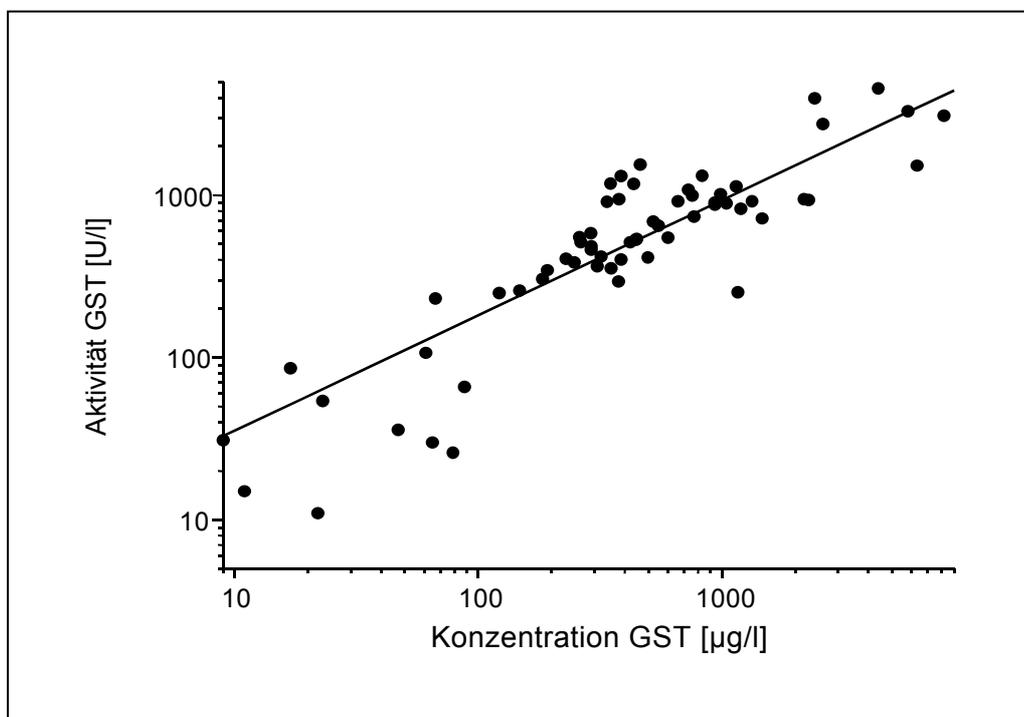
### 3.1.3. Korrelation des Ischämieschadens mit dem Reperfusionsschaden anhand der Enzymaktivitäten



**Abbildung 3. 4.:** Korrelation der postoperativen Maxima der Enzymaktivitäten von ALT, AST und GST im Serum mit der Enzymaktivität im Perfusat

Die Enzymaktivitäten im Perfusat (Ischämieschaden) wurden mit den Maximalwerten der Enzymaktivitäten während der Reperfusion (Reperfusionsschaden) korreliert (**Abb. 3. 4.**). Die beste Korrelation zeigte hierbei die Aktivität der GST ( $\rho = 0,7$ ;  $p < 0,0001$ ). Im Vergleich dazu zeigten die AST-Aktivität ( $\rho = 0,5$ ;  $p = 0,005$ ) und die ALT-Aktivität ( $\rho = 0,5$ ;  $p = 0,005$ ) eine geringere Korrelation.

#### 3.1.4. Korrelation der enzymatischen Aktivität der GST mit der Konzentration von $\alpha$ -GST im Serum



**Abbildung 3. 5.:** Korrelation der enzymatischen Aktivität der GST mit der Konzentration von  $\alpha$ -GST im Serum ( $\rho=0,90$ )

Die Leberzellschädigung wurde anhand der GST-Aktivität im Serum erfaßt, die mit der Methode nach Habig bestimmt wurde. Die Konzentration der  $\alpha$ -GST im Serum wurde mittels eines Enzymimmunoassays bestimmt. Die Werte der

GST-Aktivität im Serum und die Werte der  $\alpha$ -GST Konzentration im Serum zeigen eine hohe Korrelation ( $\rho = 0,90$ ) (**Abb. 3. 5.**).

### 3.2. Vergleich der Volumenersatzlösungen

In diesem Teil der Untersuchung soll die Auswirkung der drei verschiedenen Volumenersatzlösungen Diaspirin-Crosslinked Hemoglobin (DCLHb), Hyperhes (HHES) und Haes-steril auf den Verlauf der Leberschädigung nach Ischämie und Reperfusion beobachtet werden.

Als Meßparameter dienen dabei die Enzymaktivitäten von GST, AST und ALT.

#### 3.2.1. Die GST-Aktivität im Serum

In der DCLHb-Gruppe stieg die GST-Aktivität in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion steil auf  $1550 \pm 405$  U/l an, das ist das 26-fache des Wertes vor Hepatektomie (**Abb. 3. 6.**). In den folgenden 15 Minuten nahm sie weiterhin leicht zu und erreichte ihr post-operatives Maximum von  $1688 \pm 416$  U/l. Danach wurde bis 65 Minuten nach Reperfusion ein leichter Abfall und Wiederanstieg auf  $1658 \pm 417$  U/l gemessen. Von da an nahm die GST-Aktivität zunächst innerhalb einer Stunde deutlich (um 28 %), dann innerhalb der nächsten drei Stunden leicht ab. Nach einem wiederum stärkeren Rückgang innerhalb der sechsten Stunde erreichte die GST-Aktivität mit  $699 \pm 193$  U/l ihr post-operatives Minimum innerhalb des Beobachtungszeitraumes, das entspricht 41 % des Maximalwertes.

In der HHES-Gruppe stieg die GST-Aktivität bis fünf Minuten nach Reperfusion stark auf  $911 \pm 256$  U/l an, das entspricht dem 28-fachen des Wertes vor Hepatektomie. 35 Minuten nach Reperfusion erreichte sie ihr post-operatives Maximum mit  $959 \pm 296$  U/l. Von da an bis zum Ende des sechsständigen Beobachtungszeitraumes folgte ein mäßiger Rückgang auf  $669 \pm 256$  U/l, welches 70 %

des Maximalwertes entspricht, wobei in der letzten Stunde ein leichter Wiederanstieg zu verzeichnen ist.

In der Kontrollgruppe stieg die GST-Aktivität in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion steil auf ihr post-operatives Maximum von  $2280 \pm 933$  U/l an, das ist das 28-fache des Wertes vor Hepatektomie. Bis drei Stunden nach Reperfusion ging die GST-Aktivität dann erheblich zurück auf ihr post-operatives Minimum von  $707 \pm 207$  U/l, das sind nur noch 31 % des post-operativen Maximums. In den nächsten drei Stunden stieg die GST-Aktivität wieder leicht bis auf  $877 \pm 295$  U/l an.

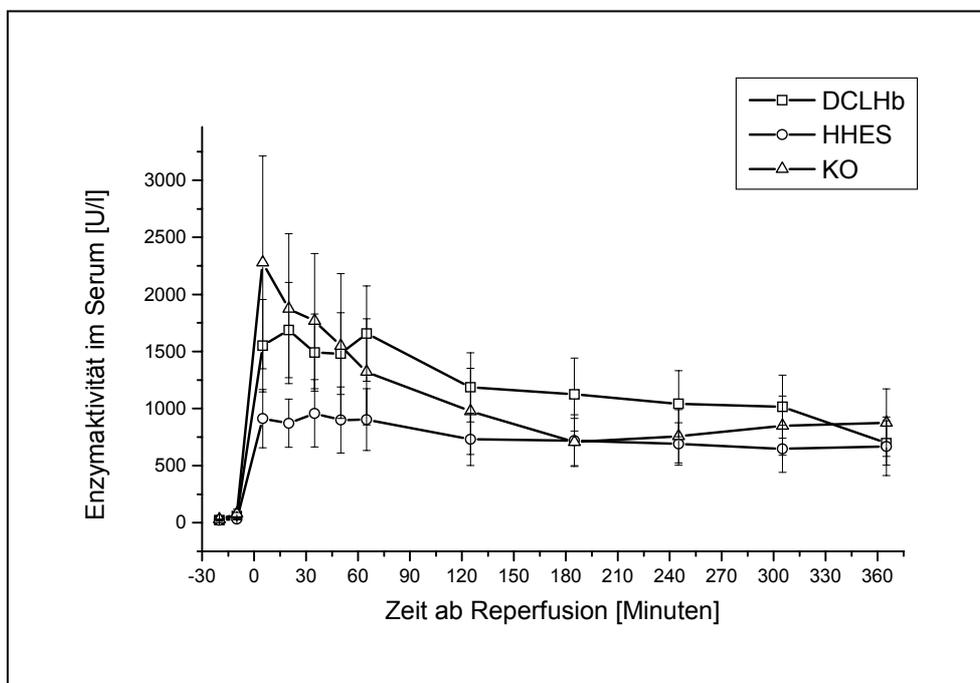
Im Vergleich waren die Werte vor Hepatektomie bei allen drei Gruppen niedrig und auf vergleichbarem Niveau. Die vorhandenen Unterschiede vergrößerten sich aber als die GST-Aktivitäten sich in allen drei Gruppen in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion mit etwa dem gleichen Faktor multiplizierten (26 bzw. 28). Dadurch ergaben sich zu diesem Zeitpunkt deutlich unterschiedliche Werte. Die Kontrollgruppe erreichte hier ihr post-operatives Maximum, die DCLHb-Gruppe erreichte es 15 Minuten später, die HHES-Gruppe nochmals 15 Minuten später.

Den relativ geringsten Anstieg verzeichnete die HHES-Gruppe, die bis fünf Minuten nach Reperfusion auf  $911 \pm 256$  U/l anstieg und von da an über ihr Maximum von  $959 \pm 296$  U/l einen insgesamt flachen Verlauf zeigte.

Den höchsten Anstieg der GST-Aktivität verzeichnete die Kontrollgruppe, bei der wiederum bis drei Stunden nach Reperfusion auch der stärkste Rückgang erfolgte, so daß sie zu diesem Zeitpunkt ganz nahe bei der insgesamt niedrigsten Kurve, derjenigen der HHES-Gruppe lag. Danach stieg die GST-Aktivität der Kontrollgruppe wieder allmählich an, so daß sie am Ende des sechsständigen Beobachtungszeitraumes deutlich über der der beiden anderen Gruppen lag.

Die DCLHb-Gruppe erreichte bis fünf Minuten nach Reperfusion einen Wert der GST-Enzymaktivität, der ungefähr zwischen der Kontroll- und der HHES-Gruppe lag. Danach stieg bei ihr die GST-Aktivität noch weiter bis auf  $1688 \pm 416$  U/l, später nochmals bis auf  $1658 \pm 417$  U/l an. Zu diesem Zeitpunkt, 65 Minuten nach Reperfusion, war die GST-Aktivität hier die höchste von allen

drei Gruppen. Sie nahm danach jedoch so weit ab, daß sie nach sechs Stunden nahe bei dem Wert der HHES-Gruppe und unter dem der Kontrollgruppe lag, wobei besonders in der letzten Stunde eine deutliche Abnahme zu verzeichnen ist.



**Abbildung 3. 6.:** Verlauf der GST-Serumaktivität im Vergleich der Volumenerersatzlösungen (DCLHb, HHES, Haes-steril)

### 3.2.2. Die AST-Aktivität im Serum

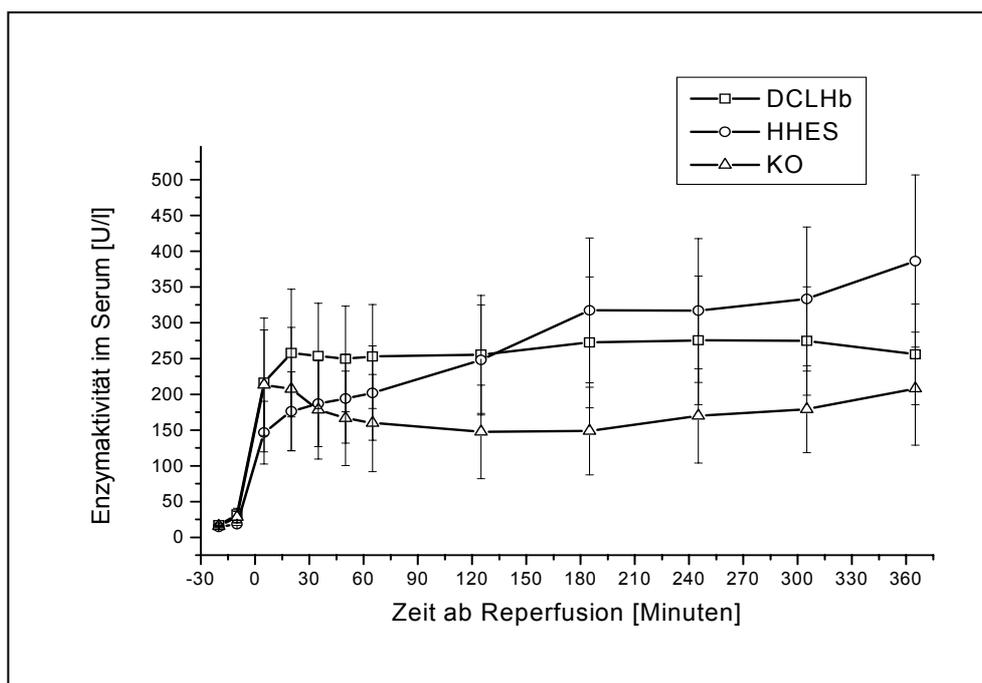
In der DCLHb-Gruppe stieg die AST-Aktivität in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion auf  $216 \pm 74$  U/l, das entspricht dem 7-fachen des Wertes vor Hepatektomie (**Abb. 3. 7.**). 20 Minuten nach Reperfusion lag der Wert mit  $258 \pm 89$  U/l fast 20 % darüber. Im weiteren Verlauf veränderte sich die AST-Aktivität nur noch wenig und erreichte vier Stunden nach Reperfusion ihren post-operativen Maximalwert mit  $275 \pm 90$  U/l. Von da an ging sie bis zum Ende des sechsstündigen Beobachtungszeitraumes auf  $256 \pm 70$  U/l zurück.

In der HHES-Gruppe stieg die AST-Aktivität in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion auf  $146 \pm 44$  U/l an, d. h. auf das 8-fache des Wertes vor Hepatektomie. Bis 65 Minuten nach Reperfusion folgte ein insgesamt flacher Anstieg

auf  $202 \pm 66$  U/l, d. h. um 38 %. Innerhalb der nächsten zwei Stunden stieg die AST-Aktivität deutlich um insgesamt 57 % auf  $317 \pm 101$  U/l an. Von da an nahm die AST-Aktivität bis zum Ende des sechsständigen Beobachtungszeitraumes zuerst nur sehr gering, in der letzten Stunde wieder etwas stärker zu und erreichte dann mit  $386 \pm 120$  U/l ihr post-operatives Maximum.

In der Kontrollgruppe stieg die AST-Aktivität in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion auf  $213 \pm 93$  U/l an, dem 8-fachen des Wertes vor Hepatektomie und erreichte damit ihren post-operativen Maximalwert. Danach ging sie langsam und wenig zurück und erreichte zwei Stunden nach Reperfusion ihr post-operatives Minimum mit  $147 \pm 65$  U/l, das entspricht 69 % des Maximalwertes. Innerhalb der folgenden vier Stunden stieg sie langsam wieder an und erreichte am Ende des Beobachtungszeitraumes den Wert  $208 \pm 79$  U/l, welcher dem post-operativen Maximalwert wieder sehr nahe kam.

Vor Hepatektomie lagen die Werte bei allen drei Gruppen auf vergleichbarem Niveau und stiegen in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion in allen Gruppen auf das sieben- bis 8-fache an. Bei der HHES-Gruppe war der Wert zu diesem Zeitpunkt geringer als bei den beiden anderen Gruppen, stieg von da aus dann aber weiter an. Die AST-Aktivität der Kontrollgruppe und der DCLHb-Gruppe war zu diesem Zeitpunkt fast gleich; bei der Kontrollgruppe ging sie ab diesem Zeitpunkt deutlich zurück und lag ab 35 Minuten nach Reperfusion unter derjenigen der HHES-Gruppe, und zwar bis zum Ende der Beobachtung. Die Enzymaktivität der DCLHb-Gruppe stieg ab fünf Minuten nach Reperfusion nochmals kurz an und blieb dann bis zwei Stunden nach Reperfusion fast unverändert. Ab zwei Stunden nach Reperfusion lagen die Enzymwerte der HHES-Gruppe über denen der DCLHb-Gruppe und waren damit die höchsten. In der letzten Stunde des sechsständigen Beobachtungszeitraumes gingen die Enzymwerte der DCLHb-Gruppe zurück, während die der anderen Gruppen anstiegen.



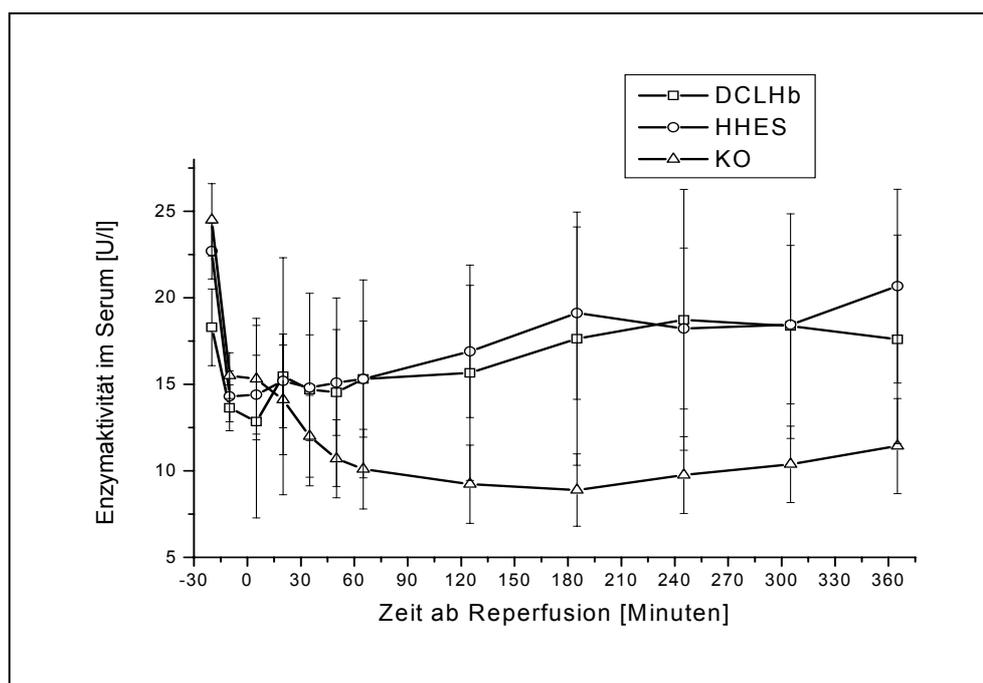
**Abbildung 3. 7.:** Verlauf der AST-Serumaktivität im Vergleich der Volumenersatzlösungen (DCLHb, HHES, Haes-steril)

### 3.2.3. Die ALT-Aktivität im Serum

In der DCLHb-Gruppe lag die ALT-Aktivität fünf Minuten nach Reperfusion bei  $13 \pm 6$  U/l (**Abb. 3. 8.**). Sie stieg danach in den nächsten 15 Minuten auf  $15 \pm 7$  U/l an. Auf dieser Höhe blieb sie bis 65 Minuten nach Reperfusion und stieg in den nächsten drei Stunden auf  $19 \pm 8$  U/l, ihren post-operativen Maximalwert an. Von diesem ging sie bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes um 1 U/l zurück. In der HHES-Gruppe begann die Kurve der Enzymaktivität fünf Minuten nach Reperfusion mit  $14 \pm 2$  U/l, stieg in den nächsten 15 Minuten auf  $15 \pm 3$  U/l und blieb auf dieser Höhe bis 65 Minuten nach Reperfusion. In der darauffolgenden Stunde stieg sie auf  $17 \pm 4$  U/l an und bewegte sich danach zwischen 18 und 21 U/l, wobei sie ihren post-operativen Maximalwert am Ende der sechsten Stunde erreichte.

In der Kontrollgruppe lag die ALT-Aktivität fünf Minuten nach Reperfusion bei  $15 \pm 4$  U/l. Von diesem Wert sank sie in den darauffolgenden drei Stunden relativ steil auf  $9 \pm 2$  U/l, ihrem post-operativen Minimum. Von diesem stieg sie bis sechs Stunden nach Reperfusion fast kontinuierlich wieder auf  $11 \pm 3$  U/l an. Im Vergleich war der deutliche Rückgang der ALT-Aktivität zwischen Laparotomie und Hepatektomie auffallend. Dieser betrifft jedoch die Empfängerleber, welche nicht Gegenstand dieser Untersuchung ist. Diese richtet sich vielmehr auf den Ischämieschaden der Spenderleber und ihre Reperfusionsschädigung im Empfängerorganismus.

Nimmt man jedoch die ALT-Werte vor Laparotomie als Normalwerte, so ist festzustellen, daß gegenüber diesen die ALT-Aktivität zunächst nach Reperfusion deutlich absank. Bei der Kontrollgruppe sank sie auch weiterhin deutlich ab und zeigte erst nach drei Stunden einen leichten Wiederanstieg, war aber am Ende



**Abbildung 3. 8.:** Verlauf der ALT-Serumaktivität im Vergleich der Volumenersatzlösungen (DCLHb, HHES, Haes-steril)

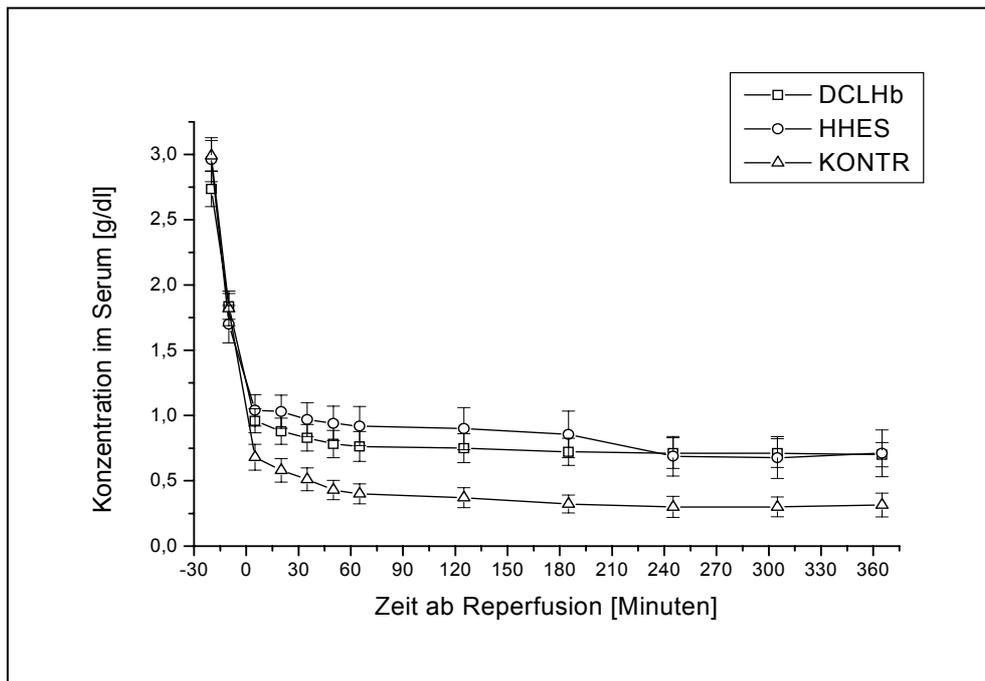
der Beobachtungszeit erst wieder auf ca. 66 % des „Normalwertes“ von  $25 \pm 2$  U/l vor Laparotomie. Bei den beiden anderen Gruppen stieg die Enzymaktivität zunächst relativ deutlich, dann langsamer wieder an (mit vorüberge-

hendem Rückgang um 1 U/l). Sie kam in der HHES-Gruppe am Ende mit  $21 \pm 6$  U/l dem „Normalwert“ wieder nahe und erreichte ihn in der DCLHb-Gruppe mit  $18 \pm 6$  U/l wieder.

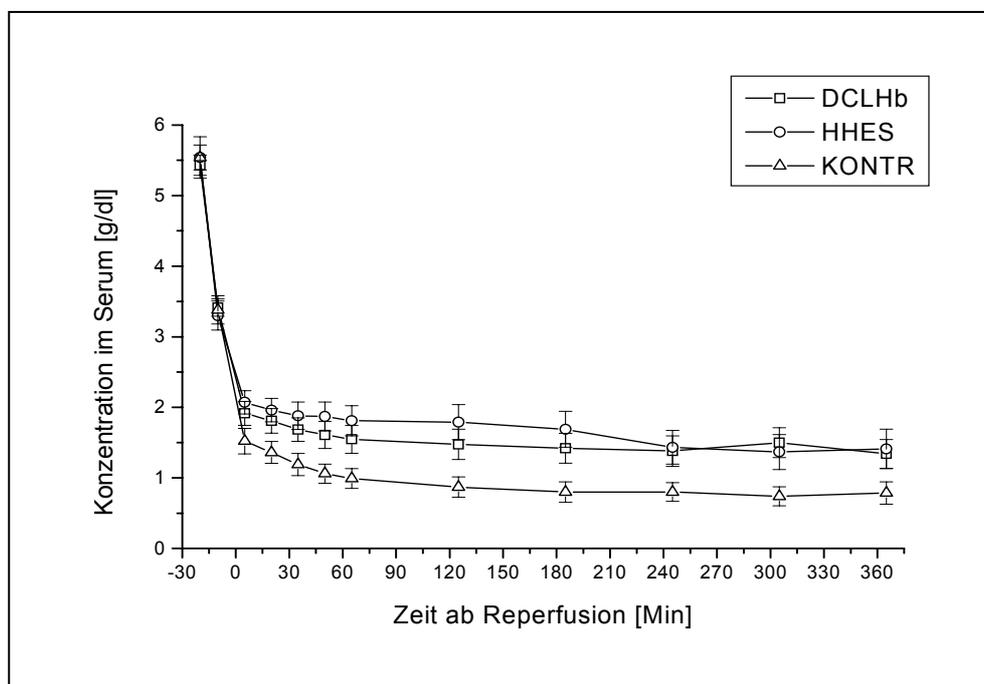
#### 3.2.4. Die Lebersyntheseparameter Albumin/Gesamteiweiß und Cholinesterase

Auffällig war die rapide Abnahme der Albumin-/Gesamteiweißkonzentration im Serum von ungefähr 30 g/l (DCLHb-Gruppe  $27 \pm 1$  g/l, HHES-Gruppe  $30 \pm 2$  g/l, Kontrollgruppe  $30 \pm 1$  g/l) vor Laparotomie auf ungefähr 20 g/l (DCLHb-Gruppe  $18 \pm 1$  g/l, HHES-Gruppe  $17 \pm 1$  g/l, Kontrollgruppe  $18 \pm 1$  g/l) vor Hepatektomie, und ein weiteres starkes Absinken auf ungefähr 7-10 g/l (DCLHb-Gruppe  $10 \pm 1$  g/l, HHES-Gruppe  $10 \pm 1$  g/l, Kontrollgruppe  $7 \pm 1$  g/l) bis fünf Minuten nach Reperfusion, d. h. unter ein Drittel des Referenzwertes vor Laparotomie (**Abb. 3. 9./3. 10.**).

Im weiteren sechsständigen Verlauf fand bei allen drei Gruppen eine geringe Abnahme der Serumkonzentration statt. Die HHES-Gruppe hatte meist eine signifikant höhere Serumkonzentration ( $p=0,05$ ) als die Kontrollgruppe, die DCLHb-Gruppe lag in den ersten vier Stunden wenig unter denen der HHES-Gruppe, danach nahe bei den Werten der HHES-Gruppe, zeigte aber zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen. Die Kurven liefen nach Reperfusion im Ganzen etwa gleich.



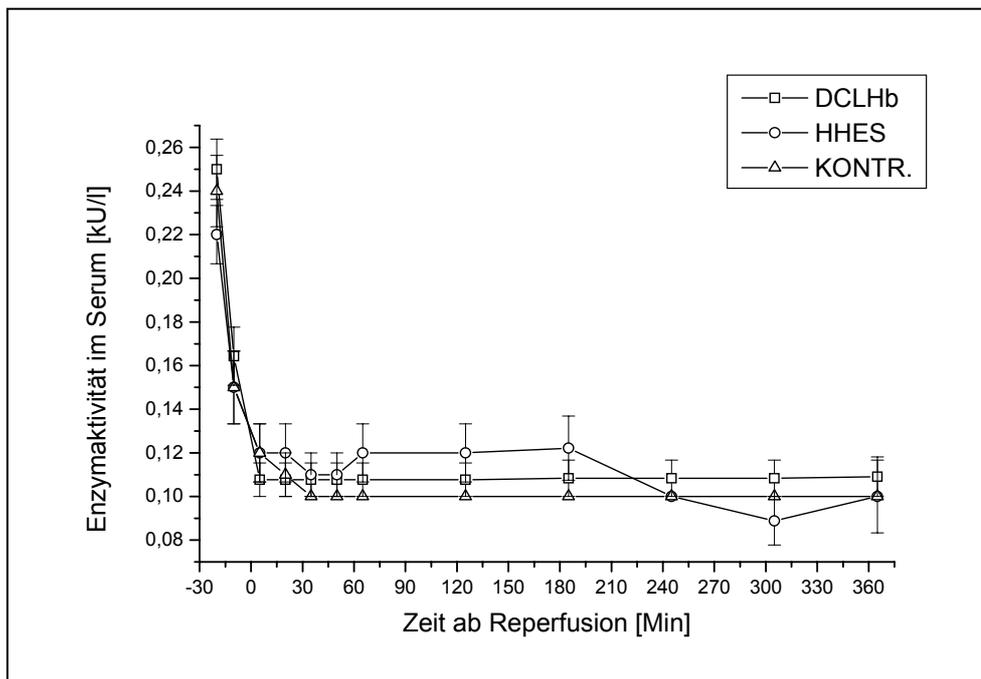
**Abbildung 3. 9.:** Verlauf der Albuminkonzentration im Serum im Vergleich der Volumenersatzlösungen (DCLHb, HHES, Haes-steril)



**Abbildung 3. 10.:** Verlauf der Gesamteiweißkonzentration im Serum im Vergleich der Volumenersatzlösungen (DCLHb, HHES, Haes-steril)

Auch bei der Cholinesterase war der Rückgang der Enzymaktivität im Serum zwischen Laparotomie und Hepatektomie in allen drei Gruppen auffallend (**Abb. 3. 11.**). Die Werte lagen vor Laparotomie zwischen 0,22 und 0,25 kU/l (DCLHb-Gruppe  $0,25 \pm 0,01$ ; HHES-Gruppe  $0,22 \pm 0,01$ ; Kontrollgruppe  $0,24 \pm 0,02$ ) und fielen auf Werte zwischen 0,15 und 0,16 kU/l (DCLHb-Gruppe  $0,16 \pm 0,01$ ; HHES-Gruppe  $0,15 \pm 0,02$ ; Kontrollgruppe  $0,15 \pm 0,02$ ), d. h. auf ungefähr zwei Drittel des Ausgangswertes.

Nach einem weiteren deutlichen Rückgang zu Beginn der Reperfusion blieben die Werte der DCLHb- und der Kontrollgruppe praktisch unverändert.



**Abbildung 3. 11.:** Verlauf der Cholinesteraseaktivität im Serum im Vergleich der Volumenersatzlösungen (DCLHb, HHES, Haes-steril)

## **4. Diskussion**

### **4.1. Die Lebertransplantation am Schwein**

Die Transplantationen wurden am Schwein durchgeführt. Das Modell der Lebertransplantation am Schwein ist seit den ersten Versuchen von Calne 1967 (Calne et al. 1976 a) und b)) in zahlreichen Studien etabliert (Bockhorn et al. 1972, Hell et al 1971, Wolff und Otto 1978, Oldhafer et al. 1993). Sowohl der hämodynamische Verlauf und die intraoperativen Komplikationen als auch die Größe des Organs sind mit denen des Menschen vergleichbar (Wolff und Otto 1978). Daher gelten die Ergebnisse eher als bei Versuchen mit anderen Tieren als auf den Menschen übertragbar. Eine uneingeschränkte Übertragbarkeit ist jedoch sicherlich nicht gegeben (Wolff und Otto 1978). Im Rahmen unserer Studie hat sich zum Beispiel die ALT, die beim Menschen ein sicherer und sensitiver Parameter für hepatozelluläre Schädigung ist (Thomas 1992, Rosen et al. 1998), bei Schweinen als ungeeignet für die Messung dieser Schädigung erwiesen. Die vorliegende Studie wurde unter standardisierten Bedingungen im Hinblick auf Spender- und Empfängerparameter durchgeführt. Weder akute Abstoßungsreaktionen noch Hepatitis-C-Infektionen spielten eine Rolle. Deswegen können wir annehmen, daß das Ansteigen der Enzymaktivitäten im Serum während und nach der Lebertransplantation auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden zurückzuführen ist.

### **4.2. Bypassverfahren**

Die labile Kreislaufregulation im Schweineorganismus macht die Anlage eines Bypass nötig. Gegenüber dem herkömmlichen, von Calne entwickelten Bypassverfahren (Calne et al. 1967 b)), hat die im Rahmen dieser Studie entwickelte und angewandte Methode deutliche Vorteile gezeigt: es konnten gegenüber Transplantationen, die ohne diese technische Variante durchgeführt wur-

den, Volumen- und Katecholamingaben erheblich eingespart werden (Viebahn et al. 1999). Außerdem war mit dieser Methode im Unterschied zum klassischen Bypass eine vollständige Überbrückung auch während der Anastomosenfertigung möglich. Da Katecholamine und Volumen nach Bedarf zur Stabilisierung der Hämodynamik zugeführt wurden, waren die gegebenen Mengen bei den einzelnen Schweinen unterschiedlich. Diese Unterschiede werden geringer, wenn der Bedarf an Katecholaminen und Volumen insgesamt verringert wird, was durch das beschriebene Bypassverfahren erreicht wurde. Entsprechend geringer wird die Beeinflussung der Meßwerte.

### **4.3. Beobachtungszeitraum**

Bei der Interpretation der Kurvenverläufe der Enzymaktivitäten im Serum blieben Fragen offen, die durch eine längere Beobachtung wahrscheinlich besser geklärt werden könnten. So die Frage, ob sich der in der sechsten Stunde in der DCLHb-Gruppe beginnende Rückgang der Enzymaktivitäten im Serum fortgesetzt hätte. Ebenso die Frage, ob sich der im gleichen Zeitraum stattfindende Anstieg der Enzymaktivitäten in den beiden anderen Gruppen fortgesetzt hätte und wenn ja, wie lange. Durch eine längere Beobachtung könnte auch geprüft werden, ob der beobachtete Rückgang der GST-Aktivität im Serum in der HHES-Gruppe tatsächlich mit entsprechender Verzögerung – bedingt durch die längere Halbwertszeit in der AST-Aktivität nachvollzogen wird.

Ganz allgemein spricht für eine längere Beobachtung, daß die Leber nach Transplantation die Proteinsynthese erst wieder nach Stunden aufnimmt und daß die AST-Aktivität in anderen Studien ihr postoperatives Maximum nach sechs Stunden (Schön et al. 1997, Tiainen et al. 1996) bzw. nach 24 Stunden (Schön et al. 1997) erreichte.

#### 4.4. GST-Enzymaktivität und $\alpha$ -GST-Enzymkonzentration im Serum

Für die Untersuchung wurde die Aktivität der GST aller Klassen gemessen. Diese Werte wurden anschließend mit denen der ALT- und AST-Aktivität verglichen und beim Vergleich der Volumenersatzlösungen herangezogen. Eine hepatozelluläre Schädigung wird bekanntlich durch ein Ansteigen der  $\alpha$ -GST im Serum angezeigt. Eine ausgeprägte hepatozelluläre Schädigung und damit die Ausschüttung von  $\alpha$ -GST ist im Modell der Lebertransplantation anzunehmen. Die festgestellte Korrelation ( $\rho = 0,90$ ) der GST-Aktivität mit der  $\alpha$ -GST-Konzentration im Serum etabliert die GST-Aktivität im Serum als spezifischen Marker für hepatozelluläre Schädigung, wobei die Ausschüttung anderer GST-Klassen aus anderen Organen vernachlässigbar gering erscheint. Bisherige Studien haben die Konzentration der  $\alpha$ -GST gemessen und mit den Aktivitäten der anderen Enzyme verglichen (Platz et al. 1999, Tiainen et al. 1996, Trull et al. 1994, Hughes et al. 1997, Schön et al. 1997, Koo et al. 2000, Giannini et al. 2000). Das in dieser Studie angewandte Verfahren hat den Vorteil, daß die Aktivitäten der genannten Enzyme miteinander verglichen werden konnten. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Bestimmung der Aktivität eines Enzyms weit weniger kostspielig und aufwendig ist, als die Bestimmung seiner Konzentration im Serum durch ein immunologisches Verfahren.

#### 4.5. GST als valider Parameter für hepatozelluläre Schädigung

Die Werte der **ALT-Aktivität** im Serum lagen in allen drei Gruppen auf sehr niedrigem Niveau und zeigten nur geringe Veränderungen (9-21 U/l). Auffallend ist, daß diese Werte bei Beginn der Reperfusion niedriger lagen, als vor Hepatektomie, nachdem sie bereits nach der Laparotomie deutlich zurückgegangen waren. Dies widerspricht der Erwartung, daß bei Reperfusionbeginn eine starke hepatozelluläre Schädigung gegeben sein müßte, welche durch die beiden anderen Enzyme AST und GST ja auch entsprechend angezeigt wird. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die ALT-Aktivität im porcinen Serum aufgrund

anderer kinetischer Eigenschaften, bedingt durch Strukturunterschiede, mit den Verfahren, welche Enzymaktivitäten im humanen Serum messen, nur unzulänglich erfaßbar ist. Präoperativ wurde jedoch eine porcine ALT-Aktivität ähnlich stark wie die von AST und GST gemessen; damit scheidet diese Erklärung aus, ebenso sind Unterschiede in der absoluten hepatozellulären Konzentration als Ursache unwahrscheinlich. Im weiteren zeigt die ALT-Kurve einen ähnlichen Verlauf wie die der AST-Aktivität, allerdings auf wesentlich niedrigerem Niveau. Insgesamt erscheint nach diesen Beobachtungen ALT bei Studien am Schwein als Indikator für hepatozelluläre Schädigung nach Lebertransplantation ungeeignet. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls eine Diskrepanz zwischen ALT- und AST-Aktivitätsverläufen bei Tierversuchen am Schwein feststellten (Hell et al. 1972, Mets et al. 1993, van Wagenveld et al. 1998, Schön et al. 1997). Redl et al. stellten bei Versuchen an Affen ebenfalls fest, daß die ALT-Werte bei Leberschädigung durch hämorrhagischen Schock sowohl in der Schock- als auch in der Wiederbelebungsphase nicht erhöht waren (Redl. et al. 1995).

Bei allen drei Volumenersatzlösungen stieg die **GST-Aktivität** im Serum unmittelbar nach Beginn der Reperfusion erheblich stärker an, als die der beiden anderen Enzyme. Sie war fünf Minuten nach Reperfusionbeginn 26-28 mal so hoch wie vor Hepatektomie und 6-11 mal so hoch wie die AST-Aktivität, während die ALT-Aktivität gleich blieb oder abnahm.

Die Kurve der GST-Werte zeigte stärkere Veränderungen als die Kurven der beiden anderen Enzyme, mit jeweils wesentlich deutlicheren und früher erreichten postoperativen Maximalwerten. Dieser schnelle Anstieg läßt sich möglicherweise auf die erhöhte Membranpermeabilität zurückführen, die durch das geringere Molekulargewicht der GST von ca. 50 kDa bedingt ist. Die GST-Aktivität war unmittelbar nach Beginn der Reperfusion nicht nur ein Vielfaches der AST-Aktivität, sondern auch gegenüber ihrem präoperativen Wert erheblich stärker angestiegen als diese. Vor Laparotomie war das Verhältnis der AST- zu den GST-Werten ca. 1:1,4 bzw. 1:1,8. Nach Beginn der Reperfusion war dieses Verhältnis ca. 1:6 bzw. 1:11. Bei einer anderen Untersuchung zur Lebertrans-

plantation am Schwein erreichte die GST-Konzentration im Serum ihr postoperatives Maximum bereits nach fünf Minuten, die AST-Aktivität dagegen erst nach sechs bzw. 24 Stunden (Schön et al. 1997). In einer Studie zur Lebertransplantation am Menschen wurde festgestellt, daß das postoperative Maximum der GST-Werte spätestens 45 Minuten nach Reperfusionbeginn erreicht wurde und daß dabei die GST-Werte wesentlich stärker anstiegen als die AST- und die ALT-Werte (Tiainen et al. 1996).

Es stellt sich die Frage, wie dieser ungleiche Anstieg zu erklären ist.

Man kann davon ausgehen, daß das präoperative Verhältnis der AST- zur GST-Aktivität im Serum, wenn es längerfristig etwa gleich bleibt, dem globalen Verhältnis der Konzentration beider Enzyme im Zytosol der Leberzellen entspricht. Eine Schädigung der Leber kann dieses Verhältnis vorübergehend verändern, wenn das eine Enzym wegen seines größeren Molekulargewichts langsamer in das Serum ausgeschüttet wird. Ein überproportionaler Anstieg der Serumwerte des einen Enzyms kann aber auch dadurch bedingt sein, daß die verschiedenen Enzyme unterschiedlich im Leberläppchen verteilt sind. Es ist festgestellt worden, daß GST homogen, das heißt sowohl perizentral als auch periportal lokalisiert ist, AST dagegen nur periportal (Rappaport 1980, Hiley et al. 1988). Ferner ist festgestellt worden, daß die perizentralen Hepatozyten von einer hypoxischen Schädigung früher betroffen sind und empfindlicher auf diese reagieren, als die periportalen (Schön et al. 1997, Redl et al. 1995). Diese beiden Feststellungen würden den erheblich stärkeren initialen Anstieg der GST-Aktivität gegenüber der AST-Aktivität im Serum erklären. Sie würden außerdem die Tatsache erklären, daß die AST-Kurve sich im weiteren Verlauf der GST-Kurve annähert. Diese Annäherung könnte unter anderem dadurch verursacht sein, daß die Schädigung allmählich von den perizentralen auf die periportalen Hepatozyten übergreift. Eine Studie am Rattenmodell untersuchte die  $\alpha$ -GST-Konzentration im Plasma bei künstlich herbeigeführter Sepsis. Eine damit verbundene Leberzellschädigung wurde durch den Anstieg der  $\alpha$ -GST-Konzentration früher und deutlicher angezeigt als durch die Lactat- und die Transaminasenwerte. Dies wurde unter anderem auf das geringe Molekulargewicht von  $\alpha$ -GST und auf die ubiquitäre Verteilung dieses Enzyms im Leber-

läppchen zurückgeführt. Parallel dazu durchgeführte mikroskopische Untersuchungen des Lebergewebes bestätigten die  $\alpha$ -GST Indikationen. Auch hier wurde im Ergebnis  $\alpha$ -GST als ein besonders sensitiver Indikator für Leberzellschädigung festgestellt (Koo et al. 2000).

Die GST-Werte gingen nach dem starken initialen Anstieg deutlicher und früher zurück, als die von AST und ALT. In der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes nahmen sie in der DCLHb-Gruppe stärker ab als die AST-Werte; in der HHES-Gruppe nahmen sie bereits ab, während die AST-Werte noch anstiegen; in der Kontrollgruppe stiegen sie weniger stark an als die der AST. Es ergibt sich also für diesen Zeitraum eine Konvergenz der beiden Kurven. Diese erscheint nicht nur durch die bereits angeführte unterschiedliche Verteilung beider Enzyme im Leberläppchen bedingt, sondern auch durch die längere Halbwertszeit der AST (17 Stunden) im Vergleich zur GST (< 90 Minuten). Die gemessenen Werte resultieren aus zwei Prozessen, nämlich der laufenden Ausschüttung des Enzyms ins Serum, und dem Abbau des im Serum vorhandenen Enzyms. Überwiegt dieser Abbau die Neuausschüttung, so gehen die gemessenen Enzymwerte zurück. Dies kann bei GST mit ihrer kurzen Halbwertszeit schon bei einem Schädigungsverlauf eintreten, bei welchem die Werte der langsamer abgebauten AST noch ansteigen. So wäre zu erwarten, daß die AST-Werte mit entsprechender Verzögerung auf das Niveau absinken, das die GST-Werte schon früher erreicht haben, und sich eine Rechtsverschiebung der fallenden AST-Kurve gegenüber der fallenden GST-Kurve ergibt. In der Kontrollgruppe, in der beide Kurven bis zum Schluß steigen, könnte der verlangsamte GST-Anstieg in der letzten Stunde als Überleitung zu ihrem Absinken interpretiert werden, welches dann die AST-Kurve entsprechend verzögert nachvollziehen würde. Dies wird jedoch innerhalb des gegebenen Beobachtungszeitraumes von sechs Stunden nicht mehr sichtbar.

Ein früher und deutlicher Rückgang der GST-Konzentration im Serum wurde in zahlreichen Studien zur Lebertransplantation festgestellt und in erster Linie mit der kurzen Halbwertszeit dieses Enzyms erklärt (Platz et al. 1999, Platz et al. 1997, Trull et al. 1994, Tiainen et al. 1996, Schenk et al. 2000, Diaz et al. 1995). In einer Arbeit über Lebertransplantation am Schwein wurde ein Rückgang der

$\alpha$ -GST-Konzentration auf die präoperativen Kontrollwerte bereits 12 Stunden nach Reperfusion gemessen, während sich die AST-Werte erst nach drei bis vier Tagen normalisierten (Schön et al. 1997).

Zusammenfassend kann festgestellt werden: die AST-Kurven entsprechen im wesentlichen den GST-Kurven, sind aber gegenüber diesen nach rechts verschoben. Dies kann mit der unterschiedlichen Verteilung der beiden Enzyme im Leberläppchen sowie ihren unterschiedlichen Halbwertszeiten erklärt werden.

Durch den initial hohen Anstieg, die deutlicheren Veränderungen und besonders das raschere Absinken der GST-Aktivität im Serum stellt sich die GST im Vergleich mit der AST und der ALT als der deutlich sensitivere und zuverlässigere Parameter für das Ausmaß hepatozellulärer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion bei der Lebertransplantation am Schwein dar. Dies wurde auch in mehreren Studien zu GST im Zusammenhang mit Lebertransplantation festgestellt (Trull et al. 1994, Platz et al. 1999, Platz et al. 1997, Tiainen et al. 1996, Schenk et al. 2000, Hughes et al. 1997). Eine klinische Studie über den Verlauf der Enzymwerte nach Hepatektomie stellte fest, daß die GST-Werte bei gutem postoperativen Verlauf ihr Maximum früher als alle anderen gemessenen Parameter erreichten, anschließend rapide absanken und innerhalb einer Woche auf ihren Normalwert zurückgingen (Matsumoto et al. 2000). Eine Studie die den Konservierungsschaden an normalen und steatotischen Rattenlebern untersuchte, kam zu dem Ergebnis, daß anhand der GST-Werte zwischen normalen und steatotischen Lebern vor Ischämie unterschieden werden kann und daß GST bei gesunden Lebern den Ischämieschaden sensitiver anzeigt als ALT und GLDH (Minor et al. 2000). Nicht nur bei Lebertransplantation, sondern auch bei chronischer Hepatitis C wurde in einer Studie durch die Veränderung der GST-Werte hepatozelluläre Schädigung angezeigt, welche mit gleichzeitig durchgeführten biochemischen und histologischen Methoden zu diesem Zeitpunkt nicht erfaßt werden konnte (Giannini et al. 2000).

Durch die hohe Sensitivität der GST ergibt sich für die klinische Praxis der Vorteil, daß eine immunsuppressive Medikation genauer dem Bedarf angepaßt werden kann. Mehrere Studien betonen diesen Nutzen zum Beispiel bei der

Behandlung von Abstoßungsreaktionen mit Steroiden (Platz et al. 1999, Platz et al. 1997, Trull et al. 1994). Ein Wiederanstieg der Enzymaktivität indiziert eine erneute hepatozelluläre Schädigung, zum Beispiel durch Abstoßungsreaktionen und macht so rechtzeitiges therapeutisches Eingreifen möglich. Die Werte der anderen Enzyme mit längeren Halbwertszeiten bleiben dagegen länger erhöht und zeigen keinen Wiederanstieg bei erneuter Komplikation (Schön et al. 1997). Der Therapieerfolg lässt sich anhand des weiteren Enzymaktivitätsverlaufes von GST deutlicher beurteilen. Nach einer Untersuchung entspricht der klinische Zustand dabei eher dem Verlauf der GST-Werte, als dem Verlauf der anderen Enzymwerte, welche auch bei einer klinischen Besserung länger erhöht bleiben (Trull et al. 1994).

Es ist davon auszugehen, daß die Enzymaktivität im Perfusat praktisch ausschließlich den Ischämieschaden anzeigt, da das Perfusat unmittelbar bei Beginn der Reperfusion aus einer Lebervene entnommen wurde (Lange et al. 1996). Die Enzymaktivität im weiteren Verlauf zeigt dagegen in höherem Maße den Reperfusionsschaden an. Durch die Reperfusion wird der Schaden deutlich, der während der Ischämie entstanden ist (Clavien et al. 1992, Grinyó 1997, Schön et al. 1998), das heißt der Reperfusionsschaden beruht wesentlich auf dem Ischämieschaden und folglich müßte die Enzymaktivität im Perfusat mit den postoperativen Maxima der Enzymaktivität im Serum nach Reperfusion korrelieren. Eine solche Korrelation zeigte sich am deutlichsten bei der GST ( $p=0,7$ ), welche sich somit auch an dieser Stelle als der zuverlässigste Indikator für den Ischämie- und Reperfusionsschaden erweist.

#### **4.6. Vergleich der Volumenersatzlösungen**

Nachdem die GST als der sensitivere und zuverlässigere Parameter für den hepatozellulären Ischämie- und Reperfusionsschaden festgestellt ist, wäre es auch denkbar, die Wirkung der verschiedenen Volumenersatzlösungen nur anhand des Verlaufs der GST-Aktivität zu vergleichen. Da die GST aber noch

nicht zu den etablierten Routineparametern gehört, wurde die AST als etablierter Parameter in die Untersuchung einbezogen.

Die ALT, welche sich als unergiebig für die Messung des hepatozellulären Ischämie- und Reperfusionsschadens bei Schweinen herausgestellt hat, soll bei diesem Vergleich im wesentlichen außer Betracht bleiben.

In den ersten 20 Minuten der Reperfusion zeigte sich folgendes Bild:

In der Kontrollgruppe stiegen die Enzymwerte sofort stark an und erreichten bereits nach fünf Minuten ihr jeweiliges postoperatives Maximum. Danach folgte bei beiden Enzymen ein deutlicher bzw. starker Rückgang der Aktivität. Es ergab sich also eine frühe und ausgeprägte Spitze der Kurven. Die Enzymwerte der Kontrollgruppe lagen an diesem Punkt erheblich höher als in den beiden anderen Gruppen: Die GST-Aktivität zum Beispiel war doppelt so hoch wie in der HHES-Gruppe und 1,5 mal so hoch wie in der DCLHb-Gruppe.

Die HHES-Gruppe zeigte zu Beginn der Reperfusion einen langsameren Anstieg der Enzymaktivitäten auf ein zunächst deutlich niedrigeres Niveau. Sie zeigte danach keinen markanten Rückgang der GST-Aktivität und einen fortlaufenden Anstieg der AST-Aktivität bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes.

In der DCLHb-Gruppe stieg die GST-Aktivität in den ersten fünf Minuten nach Reperfusion auf einen Wert, der zwischen den Werten der beiden anderen Gruppen lag. Die AST-Aktivität stieg zunächst etwa so stark an wie in der Kontrollgruppe und nahm danach noch deutlich weiter zu.

Sowohl in der HHES- als auch in der DCLHb-Gruppe stieg die GST-Aktivität im Serum in den ersten fünf Minuten der Reperfusion weniger stark an als in der Kontrollgruppe, nahm dann aber später noch weiter zu. In beiden Gruppen zeigte sich also ein gegenüber der Kontrollgruppe verlangsamter Anstieg der Enzymaktivitäten.

Will man die beschriebenen Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten der drei Gruppen bei Reperfusionbeginn erklären, so ist davon auszugehen, daß die ersten postoperativen Werte weniger den Verlauf der eben stattfindenden Reperfusionsschädigung abbilden als vielmehr den Ischämieschaden. Eine ex-

akte Trennung des Ischämieschadens vom Reperfusionsschaden ist allerdings nicht möglich, da der Reperfusionsschaden die Fortsetzung des Ischämieschadens darstellt, das heißt die Zellveränderungen und Stoffwechselfvorgänge während der Ischämie führen bei der Reperfusion und der damit verbundenen Sauerstoffzufuhr zur Reperfusionsschädigung der Leber (Grinyó 1997, Clavien et al. 1992). Diese setzt zwar gleich zu Beginn der Reperfusion ein, kann jedoch nicht die hohe initiale Enzymaktivität im Serum erklären. Diese dürfte vielmehr dadurch bedingt sein, daß eine hepatozelluläre Schädigung bereits während der Ischämie stattgefunden hat und die dabei freigewordenen Enzyme mit Einsetzen der Reperfusion in hoher Konzentration in den Blutkreislauf gelangen. Die ersten postoperativen Werte der Enzymaktivität dürften also nur bedingt Aufschluß geben über die positive oder negative Wirkung der verschiedenen Volumenersatzlösungen auf das Reperfusionsgeschehen. Der raschere und höhere Anstieg der Enzymaktivität in der Kontrollgruppe könnte dann eher damit erklärt werden, daß bei Anwendung von Haes-steril die bereits vorher freigewordenen und angesammelten Enzyme rascher in den Blutkreislauf aufgenommen werden als bei Anwendung von HHES und DCLHb.

Auffallend ist in der Kontrollgruppe der rasche und starke Rückgang der GST-Aktivität nach dem initialen postoperativen Maximalwert. Auch die AST-Aktivität geht in dieser Gruppe stärker zurück als in den beiden anderen. Die GST-Aktivität aber fällt in den ersten 60 Minuten nach dem Maximalwert von 2280 U/l auf 1323 U/l ab. Nimmt man für die GST eine Halbwertszeit von 60 Minuten an (Trull et al. 1994), so müßte in diesem Zeitraum, wenn keine Neuausschüttung des Enzyms stattfände, die Aktivität von 2280 U/l auf 1140 U/l zurückgehen. Dieser Wert liegt nahe bei dem gemessenen Wert von 1323 U/l. Das würde bedeuten, daß in dem fraglichen Zeitraum relativ wenige Zellen geschädigt werden und entsprechend wenig GST ins Serum ausgeschüttet wird.

Setzt man die GST-Halbwertszeit näher bei 90 Minuten an (Schön et al. 1997, Tiainen et al. 1996), so würde sich in diesem Stadium eine noch geringere Neuausschüttung von GST ins Serum ergeben. Es stellt sich die Frage, ob neben dem GST-Abbau noch andere Faktoren die Enzymkonzentration im Serum vermindert haben könnten, zum Beispiel ein Verdünnungseffekt durch Volu-

mengabe. Diese Faktoren müßten jedoch spezifisch für die Kontrollgruppe nachgewiesen werden, da ein ähnlich deutlicher und früher Rückgang der Enzymaktivitäten in den beiden anderen Gruppen nicht beobachtet wurde.

Ab 20 Minuten nach Reperfusion zeigten sich folgende Entwicklungen:

In der Kontrollgruppe waren die AST-Werte nach dem anfänglichen starken Anstieg und Rückgang bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes deutlich niedriger als in den beiden anderen Gruppen. Die GST-Werte dieser Gruppe näherten sich bis drei Stunden nach Reperfusionbeginn den bereits vorher niedrigeren Werten der HHES-Gruppe an und lagen dann bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes etwas über diesen. Die Aktivität beider Enzyme stieg ab zwei bzw. drei Stunden nach Reperfusionbeginn wieder langsam bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an.

Der Vergleich der Kontrollgruppe mit der HHES-Gruppe ergibt zunächst kein einheitliches Bild: Nach AST-Indikation wäre, wenn man die ersten beiden Messungen außer Betracht läßt, Haes-steril die offensichtlich bessere Volumenersatzlösung. Nach der GST-Indikation hat die HHES-Gruppe die niedrigeren, also besseren Werte, die allerdings nahe bei den Werten der Kontrollgruppe liegen. Zieht man die längere Halbwertszeit der AST in Betracht, so entsprechen die Kurven der GST-Aktivität der Tendenz nach den Kurven der AST-Aktivität in beiden Gruppen: In der Kontrollgruppe entspricht einem starken Absinken der GST-Aktivität ein schwacher Rückgang der AST-Aktivität. Ebenso kann in der HHES-Gruppe einer im Gesamtverlauf etwa gleichbleibenden GST-Aktivität eine ansteigende AST-Aktivität entsprechen, da die fortlaufende Neuausschüttung der GST durch den rascheren Abbau ausgeglichen wird, was bei der langsamer zerfallenden AST nicht geschieht. Trotzdem bleibt in der HHES-Gruppe der starke und kontinuierliche Anstieg der AST-Aktivität im Serum auffallend.

In der HHES-Gruppe waren die Enzymwerte postoperativ zunächst die niedrigsten und lagen deutlich unter denen der DCLHb-Gruppe. Dies könnte darauf hinweisen, daß die osmotische Wirkung der hypertonen Lösung, das heißt die Verbesserung des hepatischen Blutflusses durch osmotische Volumenvergrö-

ßerung (Moon et al. 1996, Mazzoni et al. 1988), Verringerung der Endothelzellschwellung (Mazzoni et al. 1988, Corso et al. 1998), Verminderung der Leukozytenadhärenz (Corso et al. 1999, Vollmar et al. 1996 a)) und Relaxierung der Gefäßmuskulatur (Lundvall et al. 1969, Lauth et al. 1977) im frühen Stadium der Reperfusion für die Verbesserung der Mikrozirkulation und damit für die Minimierung des Ischämie- und Reperfusionsschadens besonders wichtig ist. In diesem Zusammenhang wäre es aufschlußreich, die Werte der Enzymaktivitäten im Serum mit den Werten zu vergleichen, die sich bei der Messung des arteriellen Blutflusses in der Leber mit fluoreszierenden Microspheres ergeben haben sowie den Werten, die für den globalen hepatischen Blutfluß mit Ultraschall-Flow-Probes gemessen wurden. Diese Ergebnisse werden in einer anderen Arbeit im Rahmen dieser Studie behandelt. In mehreren Studien wurde die Störung der hepatischen Mikrozirkulation als eine wesentliche Ursache des hepatozellulären Ischämie- und Reperfusionsschadens festgestellt (Menger et al. 1999, Menger und Vollmar 2000). Diese wird wiederum vor allem durch die sinusoidale Endothelzellschwellung und die Störung des Gleichgewichts zwischen Endothelin und Stickstoffmonoxid (NO), zugunsten des Endothelins hervorgerufen. Die Endothelzellschwellung und der vasokonstriktorische Effekt des vermehrten Endothelins stören die Mikrozirkulation direkt und rufen gleichzeitig mikrovaskuläre Entzündungsreaktionen über die Freisetzung von Mediatoren und O<sub>2</sub>-Radikalen, Exprimierung von Adhäsionsmolekülen und darauffolgende Leukozyten- und Thrombozytenadhärenz am sinusoidalen Endothel hervor, welche als wesentliche Ursache des postischämischen Reperfusionsschadens ~~Mehrere Studien (Vollmar et al. 1995)~~ günstigen Kreislaufeffekte von hypertonen Lösungen und ihre protektive Wirkung speziell auf das Lebergewebe nach hämorrhagischem Schock dar (Corso et al. 1998, Alemayehu et al. 1996, Matsuo-ka et al. 1996, Vollmar et al. 1994, Maningas 1987).

Ab 20 Minuten nach Reperfusionbeginn verschlechterte sich jedoch die Relation der Enzymwerte der HHES-Gruppe zu denen der beiden anderen Gruppen fortlaufend. Zum einen durch den starken Anstieg der AST-Aktivität in der HHES-Gruppe, zum anderen durch den stärkeren Rückgang der GST-Aktivität

in den anderen Gruppen. Die AST-Werte stiegen in der letzten Stunde des Beobachtungszeitraumes nochmals deutlich an und lagen erheblich über denen der Kontroll- und der DCLHb-Gruppe. Auch die GST-Werte nahmen in dieser Gruppe im gleichen Zeitraum wieder zu, wenn auch nur leicht. Vermutlich stellt sich nach der Gabe einer hypertonen Lösung innerhalb eines gewissen Zeitraumes wieder ein osmotisches Gleichgewicht im Organismus ein, das zum Nachlassen der protektiven Wirkung dieser Lösung auf die Leberzellen und damit zu einer Zunahme des Ischämie- und Reperfusionsschadens, also zu einem Ansteigen der Enzymaktivitäten im Serum führt. Die kurze Wirkdauer hypertoner Lösungen wurde schon in frühen Studien zur sogenannten small-volume resuscitation festgestellt und auf die schnelle Abnahme des osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extravasalraum zurückgeführt (Nakayama et al. 1984, Kreimeier und Messmer 2002). Um ihre Wirkung zu verlängern wurden der Lösung Kolloide, entweder in Form von Dextranen oder Hydroxyäthylstärke beigefügt (Walsh und Kramer 1991, Kreimeier et al. 1990). In der DCLHb-Gruppe gingen ab 20 Minuten nach Reperfusionsbeginn die Enzymwerte zurück und steigen dann wieder an, die GST-Aktivität erreichte dabei ihr postoperatives Maximum 65 Minuten nach Reperfusionsbeginn. Die AST-Werte dieser Gruppe lagen 105 Minuten lang, ihre GST-Werte fast 300 Minuten lang über denen der beiden anderen Gruppen. Dies scheint zunächst gegen DCLHb als geeignete Volumenersatzlösung zu sprechen. Möglicherweise spielt hier die stärkere Gewebeoxygenierung durch die sauerstofftransportierenden Eigenschaften des DCLHb eine Rolle. Diese könnte sich zunächst insofern negativ auswirken, als dadurch verstärkt Sauerstoffradikale frei werden, welche Zellmembranen angreifen. Denkbar wäre auch, daß die freien O<sub>2</sub>-Radikale durch Leukozytenaktivierung und –adhärenz die hepatische Mikrozirkulation einschränken. Eine vermehrte Leukozytenadhärenz tritt jedoch nach Feststellung einer Studie an Hamstern nicht ein. Diese Studie untersuchte die Wirkung von DCLHb auf die Mikrozirkulation im Muskelgewebe (Pickelmann et al. 1998). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Lebergewebe und Schweine wäre zu prüfen. Zu vermuten ist, daß der Einsatz von Radikalfängern in diesem Stadium hilfreich sein könnte, wie bereits in Studien gezeigt, in denen durch die

Anwendung dieser Stoffe eine Reduzierung des Ischämie- und Reperfusionsschadens erreicht werden konnte (Adkison et al. 1986, Rauen et al. 1994, Koepfel et al. 1996, Mizoe et al. 1997). Studien haben ergeben, daß DCLHb durch die Aktivierung von Endothelin und die Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) einen ausgeprägten vasokonstriktorischen Effekt hat (Schultz et al. 1993, Gulati et al. 1997, Katsuyama et al. 1994). Dieser könnte sich im frühen Stadium der Reperfusion, einhergehend mit der sinusoidalen Endothelzellschwellung und Leukozytenadhärenz ebenfalls nachteilig auf die hepatische Mikrozirkulation auswirken. In einer Studie über die Anwendung von DCLHb nach hämorrhagischem Schock bei Schweinen wurde ein vorübergehender Anstieg der Enzymaktivitäten von AST und ALT im Serum gemessen, anschließend durchgeführte histopathologische Untersuchungen z. B. des Lebergewebes ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Schädigung der Zellen (Dunlap et al. 1995).

Ab drei Stunden nach Reperfusionbeginn verschoben sich die Relationen zwischen den Enzymwerten der drei Gruppen fortschreitend zu Gunsten der DCLHb-Gruppe. Da in dieser Gruppe die Enzymaktivitäten entweder stärker abnahmen oder weniger stark anstiegen als in den beiden anderen Gruppen. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes gingen die AST- und die GST-Aktivität in der DCLHb-Gruppe zurück, während sie in beiden anderen Gruppen zunahm. Das könnte darauf hinweisen, daß längerfristig der Einsatz von DCLHb den Reperfusionsschaden wirksam mindert. Die stärkere Gewebeoxygenierung, die möglicherweise zunächst mehr negative Nebenwirkungen hatte, würde sich also im weiteren Verlauf positiv auswirken. In einer Studie über die Wirkung von verschiedenen Volumenersatzlösungen nach hämorrhagischem Schock bei Schweinen wurde festgestellt, daß eine Lösung mit DCLHb den mittleren arteriellen Druck, den arteriellen O<sub>2</sub>-Gehalt und den Säure-Basen-Haushalt rascher verbesserte als Lösungen ohne DCLHb (Dunlap et al. 1995). Eine weitere Studie verglich DCLHb mit isotoner und hypertoner Salzlösung als Volumenersatzmittel bei Ratten nach hämorrhagischem Schock und kam zu dem Ergebnis, daß durch die Anwendung von DCLHb das Basendefizit geringer war und der O<sub>2</sub>-Verbrauch deutlicher verbessert wurde als durch die beiden anderen Lösungen (Cohn und Farrell 1995).

Auch in dieser Frage würde eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum als sechs Stunden in der vorliegenden Studie sicherlich mehr Klarheit bringen.

Die Indikatoren der Syntheseleistung wie Albumin, Cholinesterase und die Mehrzahl aller Faktoren des Gerinnungs- und Fibrinolyseystems charakterisieren das Ausmaß des funktionellen Leberschadens.

Vergleicht man die Wirkung der verschiedenen Volumenersatzlösungen anhand des Verlaufs des Albumins, so zeigte sich ein starkes und frühes Absinken der Konzentration im Serum in allen drei Gruppen. Auffällig war dabei ein erstes starkes Absinken bereits vor Hepatektomie. Es folgte ein weiteres deutliches Absinken bis fünf Minuten nach Reperfusionbeginn, anschließend veränderten sich die Kurven nur noch wenig.

Eine pathologisch vermehrte renale Ausscheidung kann nicht die Ursache für den rapiden initialen Rückgang der Serumkonzentration sein. Ebenso wenig kann eine verminderte Synthese den Rückgang erklären, da bei der langen Halbwertszeit des Albumins von 19 Tagen (Thomas 1992, Reed et al. 1988) sich selbst bei einem völligen Aussetzen der Synthese die Konzentration im Serum nur sehr viel langsamer vermindern würde. Auch eine Verdünnung des Serums durch intraoperativen Volumenersatz kann als Ursache für den raschen initialen Konzentrationsrückgang ausgeschlossen werden, da zwischen Laparotomie und Hepatektomie keine oder nur eine geringe Zufuhr von Volumen erfolgte. Auch nach Hepatektomie war die Volumenzufuhr nicht so hoch, daß sich daraus eine weitere Halbierung der Albuminkonzentration im Serum ergeben hätte. Albumin gehört zu den „Anti-Akute-Phase-Proteinen“. Veränderungen der Albuminkonzentration im Serum sind im wesentlichen durch Verteilungsstörungen, weniger durch Synthesestörungen bedingt (Thomas 1992). Eine Verlagerung des Albumins aus dem vaskulären Bereich, bzw. aus dem Serum bleibt als möglicher Grund zu vermuten. Dies würde Beobachtungen entsprechen, die in anderen Studien bereits in den frühen Jahren der experimentellen Lebertransplantation gemacht wurden (Otto und Grossmann 1976, Kashiwagi et al. 1968). Auch hier überstieg der Verlust der Serumproteine bei weitem das Ausmaß, das auf Grund ihrer Halbwertszeit zu erwarten wäre, und man nahm eine Se-

questration ins Splanchnikusgebiet an. Des weiteren wurde in diesen Studien ein Zusammenhang der Serumproteinkonzentration mit dem Grad der Leberschädigung aufgezeigt und die Wiederaufnahme der Synthese nach Transplantation nachgewiesen. Ein Ansteigen der Konzentration im weiteren Verlauf wäre also zu erwarten, dabei würde vermutlich der Einfluß der verschiedenen Volumenersatzlösungen auf die Proteinsynthese und damit der jeweilige Grad der Leberschädigung sichtbar werden. Im gegebenen Zeitraum ist zeitweilig eine signifikant geringere Albuminkonzentration im Serum der Kontrollgruppe gegenüber der HHES-Gruppe festgestellt worden. Diese erklärt sich wahrscheinlich mit einem Verdünnungseffekt durch vermehrte intraoperative Volumenzufuhr in dieser Gruppe.

Innerhalb des sechsstündigen Beobachtungszeitraumes nimmt die transplantierte Leber die Neusynthese noch nicht wieder auf, das im Serum eine Stunde nach Reperfusion noch vorhandene Albumin zeigt aufgrund seiner langen Halbwertszeit wenig Veränderungen.

Die hier über das Albumin gemachten Aussagen scheinen ohne weiteres übertragbar auf das Gesamteiweiß, da die Kurven der Gesamteiweißkonzentration – auf entsprechend höherem Niveau denen der Albuminkonzentration fast völlig entsprechen.

Die Werte der Cholinesterase im Serum zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die des Albumins. Auch hier wurde ein deutlicher Rückgang der Enzymaktivität im Serum zwischen Laparotomie und Hepatektomie in allen drei Gruppen beobachtet. Das Absinken der Enzymaktivität muß eine Folge der Laparotomie, bzw. damit unmittelbar verbundener Maßnahmen sein. Es erklärt sich nicht durch ein Absinken der Cholinesterasesynthese in der Leber, da bei einer Halbwertszeit von fünf bis zwölf Tagen (Thomas 1992, Ostergaard et al. 1988) die Aktivität im Serum nicht so stark und rasch zurückgehen dürfte. Ein Volumenersatz fand im fraglichen Zeitraum nicht oder nur in geringem Maße statt, also scheidet ein Verdünnungseffekt als mögliche Erklärung auch hier aus. Er könnte allenfalls den Rückgang in der HHES-Gruppe nach fünf Stunden erklären. Die geringfügig niedrigere Aktivität im Serum der Kontrollgruppe könnte

ebenfalls mit einer Verdünnung durch vermehrte Volumengaben in dieser Gruppe erklärt werden.

Eine Inaktivierung der Cholinesterase muß angenommen werden; die stattgefundenene intraoperative Heparinisierung könnte als Grund dafür in Frage kommen (Thomas 1992).

Anhand des Verlaufs der Lebersyntheseparameter lassen sich in dieser Studie, bedingt durch die Kürze des Beobachtungszeitraumes und die lange Halbwertszeit der einzelnen Parameter keine Aussagen über die Auswirkung der verschiedenen Volumenersatzlösungen auf den Reperfusionsschaden machen.

#### **4.7. Schlußfolgerung**

ALT hat sich als ungeeigneter Parameter zur Einschätzung des Ischämie- und Reperfusionsschadens nach Lebertransplantation am Schwein erwiesen. Zum einen wegen geringer und langsamer Veränderung ihrer Aktivität im Serum, was in erster Linie durch ihre lange Halbwertszeit bedingt ist, zum anderen wegen der paradoxen Veränderung ihrer Werte, das heißt ihren Rückgang in Phasen, in denen eine starke hepatozelluläre Schädigung anzunehmen ist, und durch andere Enzyme auch angezeigt wurde.

Der Vergleich der verschiedenen Volumenersatzlösungen ergab keine eindeutig und durchgängig bessere Wirkung der einen gegenüber den anderen, gemessen an den Enzymwerten. Die Kontrollgruppe hatte nach initial hohen Werten die niedrigsten Enzymaktivitäten im Serum, zeigte aber dann steigende Tendenz und näherte sich den höheren Werten der anderen Gruppen bzw. übertraf sie. Die HHES-Gruppe zeigte im frühen Stadium der Reperfusion die besten Enzymwerte, was mit der Verbesserung der Hämodynamik durch osmotischen Effekt erklärt werden kann. Dieser läßt jedoch bald nach, was den späteren Anstieg der Enzymaktivitäten im Serum erklären kann. Die DCLHb-Gruppe, deren Enzymwerte zwischenzeitlich die höchsten waren, verbesserte ihre Position im späteren Verlauf, das heißt ihre Enzymwerte gingen zurück. Es wird vermutet,

daß die stärkere Oxygenierung durch die O<sub>2</sub>-transportierenden Eigenschaften des DCLHb sowie sein vasopressorischer Effekt hierfür ursächlich waren. Möglicherweise wirken sich genau diese beiden Eigenschaften zunächst negativ, im späteren Verlauf positiv auf das Lebergewebe aus.

GST hat sich durch die wesentlich deutlichere Zunahme und die frühere und deutlichere Abnahme ihrer Aktivität im Serum als ein besonders sensibler und zuverlässiger Parameter für das Ausmaß hepatozellulärer Schädigung erwiesen. Die erstere kann zurückgeführt werden auf die homogene Verteilung der GST im Leberläppchen und auf ihr relativ geringes Molekulargewicht, das die GST rascher aus geschädigten Hepatozyten ins Serum austreten läßt. Die kurze Halbwertszeit der GST läßt ihre Aktivität im Serum bei nachlassender hepatozellulärer Schädigung rascher und deutlicher zurückgehen. Die sensitive und deutliche Indikation der GST ermöglicht in der klinischen Praxis ein schnelleres und dem Bedarf angepaßtes Eingreifen, besonders auch bei später auftretenden Komplikationen.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen einer Lebertransplantation werden Leberzellen durch ischämiebedingte Hypoxie zum Teil irreversibel geschädigt. Gleichzeitig laufen im Stoffwechsel der Zellen Vorgänge ab, die sich bei der Reperfusion und der damit verbundenen Wiederaufnahme von Sauerstoff in einer weiteren Zellschädigung fortsetzen. Eine Abschätzung dieser Schädigung ist wichtig, unter anderem um rechtzeitig und bedarfsorientiert therapeutisch eingreifen zu können. Enzymaktivitäten im Serum geben Hinweise auf das Ausmaß des Zellschadens.

In dieser Studie wurde der Wert der Glutathion-S-Transferase (GST) als Parameter zur Messung des Ischämie- und Reperfusionsschadens untersucht. GST eignet sich hierfür durch ihre hohe Konzentration im Zytosol der Hepatozyten und ihre homogene Verteilung im Leberläppchen. Ihr geringes Molekulargewicht und ihre relativ kurze Halbwertszeit lassen vermuten, daß sie durch Ischämie und Reperfusion bedingte hepatozelluläre Schädigung sensitiver und zuverlässiger anzeigen könnte, als die bisher etablierten Parameter Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST).

Zusätzlich wurde in dieser Studie anhand der Aktivitäten von AST, ALT und GST im Serum untersucht, wie unterschiedliche Volumenersatzlösungen das Ausmaß des Ischämie- und Reperfusionsschadens beeinflussen. Dabei wurden eine isotone Salzlösung (Haes-steril), eine stark hypertone Salzlösung (HHES) und eine stromafreie Hämoglobinlösung (DCLHb) verwendet. Die O<sub>2</sub>-transportierenden Eigenschaften von DCLHb ließen eine bessere Gewebeoxygenierung bei Reperfusion und damit einen geringeren Reperfusionsschaden erwarten.

Es wurden 34 Lebertransplantationen an Schweinen durchgeführt. Den Empfängertieren wurde kurz vor Reperfusionbeginn eine Bolusinjektion der entsprechenden Volumenersatzlösung appliziert (Haes-steril n=10, HHES n=10, DCLHb n=14). Zur Messung der Enzymaktivitäten im Serum wurde den Tieren zu bestimmten festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen.

Die GST-Aktivität im Serum stieg in allen drei Gruppen bei Reperfusion wesentlich höher an, erreichte früher ihr postoperatives Maximum und nahm deutlicher und früher wieder ab als die Aktivität von ALT und AST. Die AST-Aktivität im

Serum stieg in allen drei Gruppen auf erheblich geringere Werte als die GST, erreichte ihr postoperatives Maximum in zwei Gruppen später als diese und zeigte einen geringeren Rückgang in Zeitabschnitten, in denen die GST-Werte bereits deutlich zurückgingen. Die ALT-Aktivität im Serum veränderte sich nur unerheblich und sehr langsam. Auch bewegte sie sich paradox, das heißt sie ging vor und nach Beginn der Reperfusion zurück, also in einer Phase, in der eine stärkere hepatozelluläre Schädigung zwingend anzunehmen war und von den anderen Parametern auch angezeigt wurde. Die Enzymaktivitäten im Perfusat (Ischämieschaden) wurden mit den maximalen Enzymaktivitäten während der Reperfusion korreliert. Die beste Korrelation zeigte hierbei die Aktivität der GST.

Der Vergleich der drei Volumenersatzlösungen ergab für die isotone Salzlösung Haes-steril die initial höchsten GST-Werte mit raschem Rückgang und späterem leichtem Wiederanstieg sowie initial hohe AST-Werte mit ebenfalls anschließendem deutlichen Rückgang und späterem Wiederanstieg. Für die hypertone Lösung HHES ergab sich ein initial mäßiger Anstieg der GST- und der AST-Werte mit geringem Rückgang und leichtem Wiederanstieg der GST-Aktivität in der letzten Stunde des Beobachtungszeitraumes, während die AST-Aktivität hier von Anfang bis zum Ende fortgesetzt weiter anstieg. Für die Hämoglobinlösung DCLHb ergab sich ein mittlerer initialer Anstieg der GST-Werte, die dann zuerst nur vorübergehend abnahmen und auch später nur mäßig zurückgingen, so daß sie bis fast zum Ende über denen der beiden anderen Gruppen lagen; jedoch gingen sie gegen Ende deutlicher zurück. Die AST-Werte zeigten hier einen Anstieg auf ein Niveau über den beiden anderen Gruppen, es folgten nur geringere Veränderungen, jedoch ebenfalls ein Rückgang gegen Ende des Beobachtungszeitraumes.

Der Vergleich der Volumenersatzlösungen erbrachte keine durchgängig bessere Bewertung einer von ihnen. In der HHES-Gruppe ergaben sich in der frühen Phase relativ günstige Werte, die sich im späteren Verlauf jedoch relativ zu denen der beiden anderen Gruppen verschlechterten. Umgekehrt brachte die

DCLHb-Lösung im früheren Stadium weniger günstige Werte, die sich später aber relativ zu denen der beiden anderen Gruppen verbesserten. DCLHb scheint also mittel- und längerfristig den Reperfusionsschaden wirksam zu mindern. Jedoch sollte seine Wirkung noch weiter untersucht werden, da auch in der vorhandenen einschlägigen Literatur widersprüchliche Ergebnisse vorliegen.

Durch den initial hohen Anstieg, die deutlicheren Veränderungen und besonders das raschere Absinken der GST-Aktivität im Serum stellt sich die GST im Vergleich mit der AST und der ALT als der deutlich sensitivere und zuverlässigere Parameter für das Ausmaß hepatozellulärer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion bei der Lebertransplantation am Schwein dar. Die enge Korrelation der Aktivität der GST im Perfusat (Ischämieschaden) mit ihrer maximalen postoperativen Aktivität (Reperfusionsschaden) spricht ebenfalls für die Validität der GST. Für die klinische Praxis ergibt sich daraus der Vorteil, daß eine notwendig werdende Medikation jeweils rechtzeitig und bedarfsorientiert vorgenommen und ihr Erfolg schneller und genauer eingeschätzt werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

Adkison, D., Höllwarth, M. E., Benoit, J. N., Parks, D. A., McCord, J. M.,  
Granger, D. N. (1986)

Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury in the liver  
Acta Physiol. Scand. 548 (Suppl.), 101-107

Alemayehu, A., McKirnan, M. D., Mozingo, R. D., Gray, C. G. (1996)

Hypertonic saline/dextran treatment for severe pressure-driven hemorrhage in  
dehydrated conscious swine  
Shock 6, 298-306

Anderson, B. O., Brown, J. M., Harken, A. H. (1991)

Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury  
J. Surg. Res. 51, 170-179

Angus, D. C., Clermont, G., Kramer, D. J., Linde-Zwirble, W. T., Pinsky, M. R.  
(2000)

Short-term and long-term outcome prediction with the Acute Physiology and  
Chronic Health Evaluation II System after orthotopic liver transplantation  
Crit. Care Med. 28, 150-156

Arndt, H., Kubes, P., Granger, D. N. (1991)

Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury in the small intestine  
Klin. Wochenschr. 69, 1056-1060

Awasthi, Y. C., Sharma, R., Singhal, S. S. (1994)

Human glutathione S-transferases  
Int. J. Biochem. 26, 295-308

Baron, J. F., Berridge, J., Brichant, J. F. (1997)

A randomized trial to assess the efficacy of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) solution as an alternative to blood transfusion following cardiac surgery

Anesthesiology 87, 217

Baron, J. F. (1998)

Haemoglobin therapy in clinical practice: use and characteristics of DCLHb

Br. J. Anaesth. 81 (Suppl.) 34-37

Beckett, G. J., Chapman, B. J., Dyson, E. H., Hayes, J. D. (1985)

Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage

Gut 26, 26-31

Beckett, G. J., Hussey, A. J., Laing, I., Howie, A. F., Hayes, J. D., Strange, R. C., Faulder, C. G., Hume, R. (1989)

Measurements of glutathione S-transferase B<sub>1</sub> in plasma after birth asphyxia: an early indication of hepatocellular damage

Clin. Chem. 35, 995-999

Behrend, M., Steinhoff, G., Wonigeit, K., Pichlmayr, R. (1991)

Patterns of adhesion molecule expression in human liver allografts

Transplant. Proc. 23, 1419-1420

Belzer, F. O., Southard, J. H. (1988)

Principles of solid organ preservation by cold storage

Transplantation 45, 673-676

Bilzer, M., Paumgartner, G., Gerbes, A. L. (1999)

Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation

Gastroenterol. 117, 200-210

Bismuth, H., Castaing, D., Ericzon, B. G., Otte, J. B., Rolles, K., Ringe, B., Sloof, M. (1987)

Hepatic transplantation in Europe

Lancet 2, 674-676

Bockhorn, H., Grotelüschen, B., Tidow, G., Lauchart, W., Ziegler, H., Coburg, A., Schmidt, E., Lesch, P., Taegder, K., Pfeiffer, A., Seidler, D., Trautwein, G., Pichlmayer, R. (1972)

Die allogene Schweinelebertransplantation. Eine funktionelle, enzymatische und morphologische Studie unter Berücksichtigung der Frage der Abstoßung oder immunologischen Toleranz

Langenbecks Arch. Chir. Forum (Suppl.), 135-138

Bonventre, J. V., Cheung, J. Y. (1985)

Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia

Am. J. Physiol. 249, 149-159

Booth, J., Boyland, E., Sims, P. (1961)

An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione

Biochem. J. 79, 516-524

Boyer, T. D. (1989)

The glutathione S-transferases: an update

Hepatology 9, 486-496

Bunn, H. F., Esham, W. T., Bull, R. W. (1969)

The renal handling of hemoglobin

I. glomerular filtration

J. Exp. Med. 129, 909-924

Busch, M., Schenk, M., Zipfel, A., Müller, M., Lassak, P., Dieterich, H. J., Viebahn, R. (2000)

Glutathione S-transferase as a valid marker for reperfusion injury in porcine liver transplantation

Shock 13 (Suppl.), 61 (Abstract)

Bzeizi, K. I., Dawkes, R., Dodd, N. J. F., Plevris, J. N., Hayes, P. C. (1997)

Graft dysfunction following liver transplantation: role of free radicals

J. Hepatol. 26, 69-74

Caldwell-Kenkel, J. C., Thurman, R. G., Lemasters, J. J. (1987)

Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers

Transplantation 45, 834-837

Calne, R. Y., White, H. J. O., Yoffa, D. E., Binns, R. M., Maginn, R. R., Herbertson, R. M., Millard, P. R., Molina, V. P., Davis, D. R. (1967 a))

Prolonged survival of liver transplants in the pig

Brit. Med. J. 4, 645-648

Calne, R. Y., White, H. J. O., Yoffa, D. E., Maginn, R. R., Binns, R. M., Samuel, J. R., Molina, V. P. (1967 b))

Observations of orthotopic liver transplantation in the pig

Brit. Med. J. 2, 478-480

- Campbell, J. A. H., Corrigan, A. V., Guy, A., Kirsch, R. E. (1991)  
Immunohistologic localisation of alpha, mu and pi class glutathione S-  
transferases in human tissues  
Cancer 67, 1608-1613
- Chatterjee, R., Welty, E. V., Walder, R. Y., Pruitt, S. L., Rogers, P. H., Arnone,  
A., Walder, J. A. (1986)  
Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked be-  
tween the alpha chains (lysine 99 alpha 1 – lysine 99 alpha 2)  
J. Biol. Chem. 261, 9929-9937
- Cheung, J. Y., Bonventre, J. V., Malis, C. D., Leaf, A. (1986)  
Calcium and ischemic injury  
N. Engl. J. Med. 314, 1670-1676
- Clavien, P. A., Harvey, P. R. C., Strasberg, S. M. (1992)  
Preservation and reperfusion injuries in liver allografts  
Transplantation 53, 957-978
- Clavien, P. A. (1998)  
Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion  
Hepatology 28, 281-285
- Clemens, M. G., Bauer, M., Pannen, B. H. J., Bauer, I., Zhang, J. X. (1997)  
Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion  
Shock 8, 80-85
- Cohn, S. M., Farrell, T. J. (1995)  
Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation of hemorrhage: comparison of a  
blood substitute with hypertonic saline and isotonic saline  
J. Trauma. 39, 210-216

Corso, C. O., Okamoto, S., Leiderer, K., Messmer, K. (1998)  
Resuscitation with hypertonic saline dextran reduces endothelial cell swelling and improves hepatic microvascular perfusion and function after hemorrhagic shock

J. Surg. Res. 80, 210-220

Corso, C. O., Okamoto, S., Ruttinger, D., Messmer, K. (1999)  
Hypertonic saline dextran attenuates leukocyte accumulation in the liver after hemorrhagic shock and resuscitation

J. Trauma. 46, 417-423

Currin, R. T., Gores, G. J., Thurman, R. G., Lemasters, J. J. (1991)  
Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox

FASEB J. 5, 207-210

D'Alessandro, A. M., Kalayoglu, M., Sollinger, H. W., Hoffmann, R. M., Reed, A., Knechtle, S. J., Pirsch, J. D., Hafez, G. R., Lorentzen, D., Belzer, F. O. (1991)

The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary non-function after orthotopic liver transplantation

Transplant. Proc. 23, 1536-1537

DelMaestro, R. F. (1980)

An approach to free radicals in medicine and biology

Acta Physiol. Scand. 492, 153

Diaz, J., Carrascosa, C., Acosta, F., Marin, C., Bueno, F. S., Canizares, F., Serano, E., Ramirez, P., Parrilla, P., Martinez, P. (1995)

Glutathione-S-transferase as a marker of acute graft rejection in orthotopic liver transplantation

Transplant. Proc. 27, 2305

Dickson, R. C., Lauwers, G. Y., Rosen, C. B., Cantwell, R., Nelson, D. R., Lau, Y. N. (1999)

The utility of noninvasive serologic markers in the management of early allograft rejection in liver transplantation recipients

Transplantation 68, 247-253

Dunlap, E., Farrell, L., Nigro, L., Estep, T., Marchand, G., Burhop, K. (1995)

Resuscitation with Diaspirin Crosslinked Hemoglobin in a pig model of hemorrhagic shock

Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 23, 39-61

Edwards, E. B., Roberts, J. P., McBride, M. A., Schulak, J. A., Hunsicker, L. G. (1999)

The effect of the volume of procedures at transplantation centers on mortality after liver transplantation

N. Engl. J. Med. 341, 2049-2053

Ellenberger, Baum (1979)

Vergleichende Anatomie der Haustiere

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Engerson, T. D., McKelvey, T. G., Rhyne, D. B., Boggio, E. B., Snyder, S. J., Jones, H. (1987)

Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues

J. Clin. Invest. 79, 1564-1570

First, M. R. (1992)

Transplantation in the nineties

Transplantation 53, 1-11

Fujita, T., Furitsu, H., Nishikawa, M., Takakura, Y., Sezaki, H., Hashida, M.  
(1992)

Therapeutic effects of superoxide dismutase derivatives modified with mono- or polysaccharides on hepatic injury induced by ischemia/reperfusion

Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 191-196

Furukawa, H., Todo, S., Inventarza, O., Casavilla, A., Wu, Y. M., Scotti-Foglieni, C., Broznick, B., Bryant, J., Day, R., Starzl, T. E. (1991)

Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution

Transplantation 51, 1000-1004

Gasbarrini, A., Borle, A. B., Farghali, H., Bender, C., Francavilla, A., van Thiel, D. (1992)

Effect of anoxia on intracellular ATP, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and cytotoxicity in rat hepatocytes

J. Biol. Chem. 267, 6654-6663

Giannini, E., Risso, D., Ceppa, P., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Malfatti, F., Romagnoli, P., Lantieri, P. B., Testa, R. (2000)

Utility of alpha-glutathione S-transferase assessment in chronic hepatitis C patients with near normal alanine aminotransferase levels

Clin. Biochem. 33, 297-301

Granger, D. N., Benoit, J. N., Suzuki, M., Grisham, M. B. (1989)

Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion

Am. J. Physiol. 257, 683-688

Grinyó, J. M. (1997)

Reperfusion injury

Transplant. Proc. 29, 59-62

- Grisham, M. B., Hernandez, L. A., Granger, D. N. (1986)  
Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia  
Am. J. Physiol. 251, 567-574
- Gulati, A., Sharma, A. C., Burhop, K. E. (1994)  
Effect of stroma-free hemoglobin and diaspirin cross-linked hemoglobin on the regional circulation and systemic hemodynamics  
Life Sci. 55, 827-837
- Gulati, A., Singh, G., Rebello, S., Sharma, A. C. (1995)  
Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats  
Life Sci. 56, 1433-1442
- Gulati, A., Sen, A. P., Sharma, A. C., Singh, G. (1997)  
Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat  
Am. J. Physiol. 273, 827-836
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974)  
Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation  
J. Biol. Chem. 249, 7130-7139
- Hansen, T. N., Dawson, P. E., Brockbank, K. G. M. (1994)  
Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance  
Cryobiology 31, 101-106
- Hayes, P. C., Hussey, A. J., Keating, J. (1988)  
Glutathione S-transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis: a more sensitive index of hepatocellular damage than aspartate transaminase  
Clin. Chem. Acta 172, 211

Hayes, P. C., Bouchier, I. A. D., Beckett, G. J. (1991)  
Glutathione S-transferase in humans in health and disease  
Gut 32, 813-818

Hell, E., Boeckl, O., Zimmermann, G., Seidl, P. (1971)  
Technik der orthotopen Lebertransplantation am Schwein  
Wien. Klin. Wschr. 83, 82-85

Hell, E., Boeckl, O., Gibitz, H. J., Zimmermann, G., Seidl, P. (1972)  
Enzymatische und histologische Veränderungen nach orthotoper Allotransplantation der Leber am Schwein  
Wien. Klin. Wschr. 84, 222-226

Hernandez, L. A., Grisham, M. B., Twohig, B., Arfors, K. E., Harlan, J. M., Granger, D. N. (1987)  
Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury  
Am. J. Physiol. 253, 699-703

Hess, J. R., Fadare, S. O., Tolentino, L. S. L., Bangal, N. R., Winslow, R. M. (1989)  
The intravascular persistence of crosslinked human hemoglobin, 351-360  
in: Brewer, G. (Hrsg.): Progress in clinical and biological research  
The red cell: seventh Ann Arbor Conference

Hiley, C., Fryer, A., Bell, J., Hume, R., Strange, R. C. (1988)  
The human glutathione S-transferases: immunohistochemical studies of the developmental expression of alpha and pi-class isoenzymes  
Biochem. J. 254, 255-259

Howard, T. K., Klintmalm, G. B., Cofer, J. B., Husberg, B. S., Goldstein, R. M., Gonwa, T. A. (1990)

The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient

Transplantation 49, 103-107

Hughes, V. F., Trull, A. K., Gimson, A., Friend, P. J., Jamieson, N., Duncan, A., Wight, D. G. D., Prevost, A. T., Alexander, G. J. M. (1997)

Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum  $\alpha$ -glutathione S-transferase concentration monitoring after liver transplantation

Transplantation 64, 1446-1452

Ikeda, T., Yanaga, K., Kishikawa, K., Kakizoe, S., Shimada, M., Sugimachi, K. (1992)

Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats

Hepatology 16, 454-461

Jaeschke, H., Farhood, A., Smith, C. W. (1990)

Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo

FASEB J. 4, 3355-3359

Jaeschke, H., Farhood, A. (1991)

Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver

Am. J. Physiol. 260, 355-362

Jaeschke, H., Smith, C. W., Clemens, M. G., Ganey, P. E., Roth, R. A. (1996)

Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils

Toxicol. Appl. Pharmacol. 139, 213-226

Janny, S., Sauvanet, A., Farges, O., LeMèe, J., Maillochaud, J. H., Marty, J., Belghetti, J. (1997)

Outcome of liver grafts with more than 10 hours of cold ischemia

Transplant. Proc. 29, 2346-2347

Kamiike, W., Burdelski, M., Steinhoff, G., Ringe, B., Lauchart, W., Pichlmayer, R. (1988)

Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation

Transplantation 45, 138-143

Kashiwagi, N., Groth, C. G., Brettschneider, L., Guptill, J., Starzl, T. E. (1968)

Effects of homograft ischemia upon serum proteins after orthotopic liver transplantation

Surgery 63, 247-251

Katsuyama, S. S., Cole, D. J., Drummond, J. C., Bradley, K. (1994)

Nitric oxide mediates the hypertensive response to a modified hemoglobin solution (DCLHb) in rats

Biotechnol. 22, 1-7

Kawano, K., Kim, Y. I., Goto, S., Nagai, T., Egashira, T., Yamanaka, Y., Kobayashi, M. (1990)

Evidence that azathioprine, as well as cyclosporine, ameliorates warm ischemia in the rat liver

Transplantation 49, 1002-1003

Kees, C., Schenk, M., Zipfel, A., Lauchart, W., Viebahn, R. (2000)

Frühe VCAM-1-Expression in Lebertransplantaten: Einfluß von Pentoxifyllin

Gastroenterol. 38, 109 (Abstract)

- Kien, N. D., Antognini, J. F., Reilly, D. A., Moore, P. G. (1996)  
Small-volume resuscitation using hypertonic saline improves organ perfusion in burned rats  
*Anesth. Analg.* 83, 782-788
- Klar, E., Angelescu, M., Zapletal, C., Kraus, T., Bredt, M., Herfarth, C. (1998)  
Definition of maximum cold ischemia time without reduction of graft quality in clinical liver transplantation  
*Transplant. Proc.* 30, 3683-3685
- Koepfel, T. A., Lehmann, T. G., Thies, J. C., Gehrcke, R., Gebhard, M. M., Herfarth, C., Otto, G., Post, S. (1996)  
Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation  
*Transplantation* 61, 1397-1402
- Koo, A., Komatsu, H. (1991)  
Leukocyte interactions with sinusoid endothelial cells in ischemic reperfused rat livers, 364  
in: Wisse, E., Knook, D. L., McCuskey, R. S. (Hrsg.): *Cells of the hepatic sinusoids*; Leiden: Kupffer Cells Foundation
- Koo, A., Komatsu, H., Tao, G., Inoue, M., Guth, P. H., Kaplowitz, N. (1992)  
Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion  
*Hepatology* 15, 507-514
- Koo, D. J., Zhou, M., Chaudry, I. H., Wang, P. (2000)  
Plasma alpha-glutathione S-transferase: a sensitive indicator of hepatocellular damage during polymicrobial sepsis  
*Arch. Surg.* 135, 198-203

- Kreimeier, U., Brueckner, U. B., Schmidt, J., Messmer, K. (1990)  
Instantaneous restoration of regional organ blood flow after severe hemorrhage: effect of small-volume resuscitation with hypertonic-hyperoncotic solutions  
J. Surg. Res. 49, 493-503
- Kreimeier, U., Messmer, K. (2002)  
Small-volume resuscitation: from experimental evidence to clinical routine. Advantages and disadvantages of hypertonic solutions  
Acta Anaesthesiol. Scand. 46, 625-638
- Kurokawa, T., Nonami, T., Harada, A., Nakao, A., Takagi, H. (1996)  
Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver  
Semin. Surg. Oncol. 12, 179-182
- Kurokawa, T., Takagi, H. (1999)  
Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury  
Transplant. Proc. 31, 1775-1776
- Lange, R., Erhard, J., Rauen, U., De Groot, H., Eigler, F. W. (1996)  
Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for perioperative evaluation of transplant quality  
Transplantation 62, 1255-1259
- Lautt, W. W., McLachlan, T. L., Brown, L. C. (1977)  
The effect of hypertonic infusions on hepatic blood flows and liver volume in the cat  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 1339-1344
- Leaf, A. (1956)  
Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume  
Biochem. J. 62, 241

Lemasters, J. J., Stemkowski, C. J., Sungchul, J., Thurmann, R. G. (1983)  
Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in  
the isolated, perfused rat liver

J. Cell. Biol. 97, 778-786

Lemasters, J. J., DiGiuseppi, J., Nieminen, A. L., Herman, B. (1987)  
Blebbing free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death  
in hepatocytes

Nature 325, 78-79

LeMoine, O., Luis, H., Stordeur, P., Collet, J. M., Goldman, M., Deviere, J.  
(1997)

Role of reactive oxygen intermediates in interleukin-10 release after cold liver  
ischemia and reperfusion in mice

Gastroenterol. 113, 1701-1706

Lowes, J. R., Hubscher, S. G., Neuberger, J. M. (1993)

Chronic rejection of the liver allograft

Gastroenterol. Clin. North Am. 22, 401-420

Lundvall, J., Mellander, S., White, T. (1969)

Hyperosmolarity and vasodilatation in human skeletal muscle

Acta Physiol. Scand. 77, 224-233

Maningas, P. A. (1987)

Resuscitation with 7,5 % NaCl in 6 % dextran-70 during hemorrhagic shock in  
swine: effects on organ blood flow

Crit. Care Med. 15, 1121-1126

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., Jornvall, H. (1985)

Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7202-7206

Marzi, I., Zhi, Z. N., Zimmermann, F. A., Lemasters, J. J., Thurman, R. G. (1989)

Xanthin and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat

Transplant. Proc. 21, 1319-1320

Matsumoto, R., Watanabe, S., Beppu, T., Futagawa, S. (2000)

Serum alpha-glutathione S-transferase: a new marker of hepatocellular damage associated with hepatectomy

Hepatol. Res. 18, 10-18

Matsuoka, T., Wisner, D. H. (1996)

Resuscitation of uncontrolled liver hemorrhage: effects on bleeding, oxygen delivery and oxygen consumption

J. Trauma. 41, 439-445

Mazzoni, M. C., Borgstroem, P., Arfors, K. E., Intaglietta, M. (1988)

Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage

Am. J. Physiol. 255, 629-637

McCord, J. M. (1985)

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury

N. Engl. J. Med. 312, 159-163

McKeown, C. M. B., Edwards, V., Philips, M. J., Harvey, P. R. C., Petrunka, C. N., Strasberg, S. M. (1988)

Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat

Transplantation 46, 178-191

Menger, M. D., Richter, S., Yamauchi, J., Vollmar, B. (1999)

Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury

Hepatology 46, 1452-1457

Menger, M. D., Vollmar, B. (2000)

Role of microcirculation in transplantation

Microcirculation 7, 291-306

Messmer, K., Kreimeier, U. (1989)

Microcirculatory therapy in shock

Resuscitation 18 (Suppl.), 51-61

Mets, B., Hickman, R., Allin, R., van Dyk, J., Lotz, Z. (1993)

Effect of hypoxia on the hepatic metabolism of lidocaine in the isolated perfused pig liver

Hepatology 17, 668-676

Minor, T., Akbar, S., Tolba, R. (2000)

Value of alpha glutathione S-transferase for in vitro evaluation of preservation injury in normal and steatotic livers

Transpl. Int. 13 (Suppl.), 551-554

Mizoe, A., Kondo, S., Azuma, T., Fujioka, H., Tanaka, K., Hashida, M., Kanematsu, T. (1997)

Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation

J. Surg. Res. 73, 160-165

Momii, S., Koga, A. (1990)

Time-related morphological changes in cold-stored rat livers: a comparison of Euro-Collins solution with UW solution

Transplantation 50, 745-750

Moon, P. F., Hollyfield-Gilbert, M. A., Myers, T. L., Uschida, T., Kramer, G. C. (1996)

Fluid compartments in hemorrhaged rats after hyperosmotic crystalloid and hyperoncotic colloid resuscitation

Am. J. Physiol. 270, 1-8

Moreno-Sanz, C., Jimenez-Romero, C., Moreno-Gonzalez, E., Garcia-Garcia, I., Seoane-Gonzalez, I., Loinaz-Seguro, C., Garcia-Urena, M. A., Gonzalez-Chamorro, A. (1999)

Primary dysfunction after liver transplantation. Is it possible to predict this complication?

Rev. Esp. Enferm. Dig. 91, 401-419

Nagral, A., Butler, P., Sabin, C. A., Rolles, K., Burroughs, A. K. (1998)

Alpha-glutathione S-transferase in acute rejection of liver transplant recipients

Transplantation 65, 401-405

Nakayama, S., Sibley, L., Gunther, R. A., Holcroft, J. W., Kramer, G. C. (1984)

Small-volume resuscitation with hypertonic saline (2,400 mosm/liter) during hemorrhagic shock

Circ. Shock 13, 149-159

Nelson, D., Azari, M., Brown, R., Burhop, K., Bush, S., Catarello, J., Chuang, H., Downing, C., Estep, T., Loewen, A., McClure, K., McDaniel, A., Michalek, E., Mozier, N., Rohn, K., Spicuzza, J., Zieske, P., Zimmermann, G. (1992)

Preparation and characterization of Diaspirin cross-linked hemoglobin solutions for preclinical studies

Biomat. Art. Cells Immob. Biotech. 20, 423-427

Nelson, D. R., Herbert, L. L., Oliver, D., Qiang, K. P., Davis, G. L., Lau, J. Y. N. (1995)

Alpha-glutathione S-transferase as a marker of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection

Am. J. Clin. Path. 104, 193-198

Oldhafer, K. J., Hauss, J., Gubernatis, G., Pichlmayr, R., Spiegel, H. U. (1993)

Liver transplantation in pigs: a model for studying reperfusion injury

J. Invest. Surg. 6, 439-450

Ostergaard, D., Viby-Mogensen, J., Hanel, H. K., Skovgaard, L. T. (1988)

Half-life of plasma cholinesterase

Acta Anaesthesiol. Scand. 32, 266-269

Otte, J. B. (1991)

Recent developments in liver transplantation: lessons from 5-year experience

J. Hepatol. 12, 386-393

Otto G., Grossmann H. (1976)

Serumproteinveränderungen unter den Bedingungen der Lebertransplantation beim Hund

Z. exper. Chirurg. 9, 136-140

Otto, G., Woll, H., David, H. (1984)

Preservation damage in liver transplantation: electron microscopic findings

Transpl. Proc. 16, 1247-1249

Pardini, R. S. (1995)

Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants

Arch. Insect. Biochem. Physiol. 29, 101-118

Pickelmann, S., Nolte, D., Leiderer, R., Schutze, E., Messmer, K. (1998)

Attenuation of postischemic reperfusion injury in striated skin muscle by dapsirin cross-linked hemoglobin

Am. J. Physiol. 275, 361-368

Platz, K. P., Mueller, A. R., Haller, G. W., Müller, C., Wenig, M., Neuhaus, R., Kottgen, E., Neuhaus, P. (1997)

Determination of alpha- and pi-glutathione-S-transferase will improve monitoring after liver transplantation

Transplant. Proc. 29, 2827-2829

Platz, K. P., Mueller, A. R., Müller, C., Wenig, M., Schumacher, G., Steinmüller, T., Köttgen, E., Neuhaus, P. (1999)

Indications for determination of alpha-glutathione-S-transferase after liver transplantation

Transplant. Proc. 31, 462-464

Pober, J. S. (1998)

Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology

Am. J. Pathol. 133, 426-433

Porte, R. J., Ploeg, R. J., Hansen, B., van Bockel, J. H., Thorogood, J., Persijn, G. G., Hermans, J., Terpstra, O. T. (1998)

Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicenter Study Group Transpl. Int. 11 (Suppl.), 164-167

Przybelski, R. J., Daily, E. K., Kisicki, J. C., Mattia-Goldberg, C., Bounds, M. J., Colbum, W. A. (1996)

Phase I study of the safety and pharmacological effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution (DCLHb)  
Crit. Care Med. 24, 1993-2000

Raison, J. K. (1973)

The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane associated enzyme systems  
J. Bioenerg. 4, 285-309

Rappaport, A. M. (1980)

Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation  
in: Javitt, N. B. (Hrsg.): International review of physiology 21, 1  
Baltimore, University Park Press

Rauen, U., Viebahn, R., Lauchart, W., de Groot, H. (1994)

The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery  
Hepatogastroenterology 41, 333-336

Reah, G., Bodenham, A. R., Mallick, A., Daily, E. K., Przybelski, R. J. (1997)

Initial evaluation of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) as a vasopressor in critically ill patients  
Crit. Care Med. 25, 1480-1488

- Redl, H., Schlag, G., Paul, E., Davies, J. (1995)  
Plasma glutathione S-transferase as an early marker of posttraumatic hepatic injury in non-human primates  
Shock 3, 395-397
- Reed, R. G., Davidson, L. K., Burrington, C. M., Peters, T. (1988)  
Non-resolving jaundice: bilirubin covalently attached to serum albumin circulates with the same metabolic half-life as albumin  
Clin. Chem. 34, 1992-1994
- Rocha e Silva, M., Velasco, I. T., Porfirio, M. F. (1990)  
Hypertonic saline resuscitation: saturated salt-dextran solutions are equally effective, but induce hemolysis in dogs  
Crit. Care Med. 18, 203-207
- Rosen, H. R., Martin, P., Goss, J., Donovan, J., Melinek, J., Rudich, S., Imagawa, D. K., Kinkhabwala, M., Seu, P., Busuttil, R. W., Shackleton, C. R. (1998)  
Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation  
Transplantation 65, 68-72
- Schanne, F. A., Kane, A. B., Young, E. E., Farber, J. L. (1979)  
Calcium dependence of toxic cell death: a common final pathway  
Science 206, 700-702
- Schareck, W. D., Schug, C., Ulrich, F., Bayer-Helms, H., Birkenhauer, U., Kehrer, G., Lauchart, W. (1991)  
Results of liver transplantation in the pig with different ischemic times and HTK-protection  
in: Kirste, G. (Hrsg.): Medizin im Blickpunkt 3, 139-148; Symposium, 1991  
Innovations-Verlags-Gesellschaft

Schenk, M., Zipfel, A., Sauer, U., Fischer-Fröhlich, C. L., Bode, C., Lauchart, W., Viebahn, R. (2000)

Evaluation of graft quality in clinical liver transplantation

Organs and Tissues 1, 17-23

Schlumpf, R. (1996)

Prinzipien der Konservierung, 18-20

in Largiadèr, F., Sturm, A., Wicki, O.: Organtransplantation

Thieme, Stuttgart, New York

Schön, M. R., Akkoc, N., Schrem, H., Keech, G., Kräutlein, K., Lemmens, H. P., Wolf, S., Tominaga, M., Kollmar, O., Neuhaus, P. (1997)

Alpha-glutathione-S-transferase is a sensitive marker of hepatocellular damage due to warm or cold ischemia in pig liver transplantation

Transplant. Proc. 29, 3036-3038

Schön, M. R., Kollmar, O., Matthes, M., Wolf, S., Schrem, H., Tominaga, M., Keech, G., Neuhaus, P. (1998)

Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation

Transplant. Proc. 30, 2318-2320

Schultz, S. C., Grady, B., Cole, F., Hamilton, I., Burhop, K., Malcolm, D. S. (1993)

A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin

J. Lab. Clin. Med. 122, 301-308

Sharma, A. C., Gulati, A. (1994 a))

Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin and norepinephrine on systemic hemodynamics and regional circulation in rats

J. Lab. Clin. Med. 123, 299-308

- Sharma, A. C., Rebello, S., Gulati, A. (1994 b))  
Regional circulatory and systemic hemodynamic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in the rat  
Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 22, 593-602
- Shiratori, Y., Kiriyaama, H., Fukushi, Y. (1994)  
Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells  
Dig. Dis. Sci. 39, 1265-1272
- Sloan, E. P., Koenigsberg, M., Gens, D., Cipolle, M., Runge, J., Mallory, M. N., Rodman, G. Jr. (1999)  
Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial  
JAMA 282, 1857-1864
- Sloan, E. P., Koenigsberg, M., Brunett, P. H., Bynoe, R. P., Morris, J. A., Tinkoff, G., Dalsey, W. C., Ochsner, M. G. (2002)  
Post hoc mortality analysis of the efficacy trial of diaspirin cross-linked hemoglobin in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock  
J. Trauma. 52, 887-895
- Snyder, S. R., Welty, E. V., Walder, R. Y., Williams, L. A., Walder, J. A. (1987)  
A hemoglobin derivative that is cross-linked between the a subunits is useful as a blood substitute  
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 7280-7284
- Sorrentino, D., Van Ness, K., Ribeiro, I., Miller, C. M. (1991)  
Functional and morphological features of isolated hepatocytes preserved in UW solution  
Hepatology 14, 331-339

Steinhoff, G., Behrend, M., Wonigeit, K. (1990)

Expression of adhesion molecules on lymphocytes/monocytes and hepatocytes in human liver grafts

Hum. Immunol. 28, 123-127

Stirpe, F., Della Corte, E. (1969)

The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)

J. Biol. Chem. 244, 3855-3863

Szabo, A., Heemann, U. (1998)

Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection

Tranplant. Proc. 30, 4281-4284

Takei, Y., Marzi, I., Gao, W., Gores, G. J., Lemasters, J. J., Thurman, R. G. (1991)

Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat

Transplantation 51, 959-965

Thomas, L. (1992)

Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 86, 87, 122, 792,

in: Thomas, L. (Hrsg.): Labor und Diagnose

4. Aufl., Die medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg

Tiainen, P., Höckerstedt, K., Rosenberg, P. H. (1996)

Hepatocellular integrity in liver donors and recipients indicated by glutathione transferase alpha

Transplantation 61, 904-908

Todo, S., Nery, J., Yanaga, K., Podesta, L., Gordon, R. D., Starzl, T. E. (1989)  
Extended preservation of human liver grafts with UW solution  
JAMA 261, 711-714

Trull, A. K., Facey, S. P., Rees, G. W., Wight, D. G. D., Noble-Jamieson, G.,  
Joughin, C., Friend, P. J., Alexander, G. J. M. (1994)  
Serum alpha-glutathione S-transferase – a sensitive marker of hepatocellular  
damage associated with acute liver allograft rejection  
Transplantation 58, 1345-1351

Varani, J., Ginsburg, I., Schuger, L., Gibbs, D. F., Bromberg, J., Johnson, K. J.,  
Ryan, U. S., Ward, P. A. (1989)  
Endothelial cell killing by neutrophils  
Am. J. Pathol. 135, 435-438

Viebahn, R., de Groot, H., Lauchart, W., Becker, H. D. (1991)  
Primary hepatocyte cultures as a model of experimental study of liver preserva-  
tion  
Langenbecks Arch. Chir. 376 (5) 268-272

Viebahn, R., Busch, M., Dettmer, M., Müller, M., Becker, H. D. (1999)  
Experimentelle Lebertransplantation am Schwein: Vollständige Bypassüberbrü-  
ckung durch ein inverses V. cava-Conduit  
Vortrag zur 116. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie vom 6.-10-  
April 1999 in München

Vollmar, B., Lang, G., Menger, M. D., Messmer, K. (1994)  
Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in  
hemorrhagic shock  
Am. J. Physiol. 266, 1927-1934

Vollmar, B., Glasz, J., Menger, M. D., Messmer, K. (1995)

Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence

Surgery 117, 195-200

Vollmar, B., Preissler, G., Menger, M. D. (1996 a))

Small volume resuscitation restores hemorrhage-induced microcirculatory disorders in rat pancreas

Crit. Care Med. 24, 445-450

Vollmar, B., Richter, S., Menger, M. D. (1996 b))

Leukocyte stasis in hepatic sinusoids

Am. J. Physiol. 270, 798-803

Van Wagenveld, B. A., Scheepers, J. J. G., Van Gulik, T. M., Frederiks, W. M., Bleeker, W. K., Obertop, H., Gouma, D. J. (1997)

Alpha glutathione S-transferase as novel parameter for hepatocellular damage in the isolated perfused rat liver

Transplant. Proc. 29, 3449-3451

Van Wagenveld, B. A., van Gulik, T. M., Gabeler, E. E., van der Kleij, A. J., Obertop, H., Gouma, D. J. (1998)

Intrahepatic tissue pO<sub>2</sub> during continuous or intermittent vascular inflow occlusion in a pig liver resection model

Eur. Surg. Res. 30, 13-25

Walsh, J. C., Kramer, G. C. (1991)

Resuscitation of hypovolemic sheep with hypertonic saline/dextran: the role of dextran

Circ. Shock 34, 336-343

Wolff, H., Otto, G. (1978)

Die Lebertransplantation im Tierexperiment

Z. Exper. Chirurg. 11, 157-176

Woods, H. F., Krebs, H. A. (1971)

Lactate production in the perfused rat liver

Biochem. J. 125, 129-139

Yokoyama, Y., Beckman, J. S., Beckman, T. K., Wheat, J. K., Cash, T. G.,  
Freeman, B. A., Parks, D. A. (1990)

Circulating xanthine oxidase: a potential mediator of ischemic injury

Am. J. Physiol. 258, 564-570

Zhou, W., McCollum, M. O., Levine, M. A., Olson, M. S. (1992)

Inflammation and platelet-activating factor production during ische-  
mia/reperfusion

Hepatology 16, 1236-1240

## 7. Abkürzungen

A.	Arteria
ATP	Adenosin-5-triphosphat
ALT	Alaninaminotransferase
AST	Aspartataminotransferase
Ca	Calcium
Ch.	Charrière (1 Ch. entspricht einem äußeren Durchmesser von 1/3 mm)
Cl	Chlorid
DCLHb	Diaspirin-Crosslinked Hemoglobin
Fr.	French (1 Fr. = 1 Ch. (s. o.))
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GSH	Glutathion ( $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinylglycin)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HAES	Hydroxyäthylstärke
HHES	Hyperhes (hypertone Hydroxyäthylstärke)
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
I.E.	internationale Einheit
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Kontrollgruppe
KOD	kolloid-osmotischer Druck
LDH	Lactatdehydrogenase
LTX	Lebertransplantation
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PVC	Polyvinylchlorid
$\rho$	Regressionskoeffizient
U	Unit
V.	Vena
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose Faktor $\alpha$

## 8. Danksagung

Folgenden Personen möchte ich danken:

Herrn Professor Dr. Richard Viebahn für die interessante Aufgabenstellung, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die operativen Fertigkeiten, die ich von ihm lernen konnte.

Frau Dr. Annette Zipfel und Herrn Dr. Martin Schenk für ihre wertvollen Anregungen und vielfältige Hilfe im Verlauf der experimentellen Untersuchungen sowie beim Verfassen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Viebahn für das angenehme Arbeitsklima und die Möglichkeit in ihrem Labor zu arbeiten.

Frau Dr. Petra Lassak und Herrn Dr. Markus Müller sowie allen an diesem Projekt beteiligten Doktoranden für die gute und fröhliche Zusammenarbeit während der tierexperimentellen Versuche.

## 9. Lebenslauf

**Name:** Mirjam Dorothea Busch

**Geburtsdatum:** 19. Juni 1974

**Geburtsort:** Esslingen am Neckar

### Schule:

1981 – 1985	Grundschule in Blaubeuren
1985 – 1989	Gymnasium in Blaubeuren
1989 – 1994	Gymnasium in Mössingen
1994	Abschluß: allgemeine Hochschulreife

### Studium:

Okt. 1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Aug. 1997	Ärztliche Vorprüfung
Feb. 1998	Beginn der Dissertation an der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen
März 1999	Erstes Staatsexamen
April 2001	Zweites Staatsexamen
16.05.2002	Drittes Staatsexamen

seit Okt. 2002	Assistenzärztin in der Allgemein Chirurgie Stadtspital Triemli, Zürich, Schweiz
----------------	--

## 10. Veröffentlichungen

- Busch M., Schenk M., Zipfel A., Müller M., Lassak P., Dieterich H. J., Viebahn R. (2000) *Glutathione S-transferase as a valid marker for reperfusion injury in porcine liver transplantation*. Shock 13 Suppl, 61 (Abstract)
- Busch M., Schenk M., Zipfel A., Müller M., Lassak P., Dieterich H. J., Viebahn R. *Glutathion-S-Transferase als valider Parameter für das Ausmaß des Reperfusionsschadens nach Lebertransplantation beim Schwein*. 9. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 26.10.2000 – 28.10.2000, Regensburg (Scientific Poster)
- Busch M., Schenk M., Zipfel A., Müller M., Lassak P., Dieterich H. J., Viebahn R. (26-10-2000) *Glutathion-S-Transferase als valider Parameter für das Ausmaß des Reperfusionsschadens nach Lebertransplantation beim Schwein*. Transplantationsmedizin Suppl. 2000, 130 (Abstract)
- Busch M., Schenk M., Dieterich H. J., Viebahn R. *Glutathione S-Transferase as a valid marker for reperfusion injury in porcine liver transplantation*. 5<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis, 29.02.2000 – 04.03.2000, München (Scientific Poster)
- Schenk M., Busch M., Zipfel A., Müller M., Lassak P., Dieterich H. J., Viebahn R. (2000) *A hypertonic-isooncotic volume substitution decreases reperfusion injury in a porcine liver transplant model*. Shock 13 Suppl., 61 (Abstract)
- Schenk M., Busch M., Zipfel A., Müller M., Lassak P., Dieterich H. J., Viebahn R. (2000) *Glutathione S-transferase as a valid marker for reperfusion injury in porcine liver transplantation*. In: Faist, E. (ed) Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis, Monduzzi Editore, Bologna, pp 337-376
- Schenk M., Busch M., Müller M., Viebahn R. *A hypertonic-isooncotic volume substitution decreases reperfusion injury in a porcine liver transplant model*. 5<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis, 29.02.2000 – 04.03.2000
- Viebahn R., Busch M., Dettmer M., Müller M., Becker H. D. (1999) Experimentelle *Lebertransplantation am Schwein: Vollständige Bypassüberbrückung durch ein inverses Vena cava-Conduit*. Vortrag zur 116. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie vom 6.-10. April 1999 in München