

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
Der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Die Beeinflussung der hyperakuten Abstossungsreaktion der
xenogen perfundierten Rattenleber durch den GP IIb/IIIa-
Rezeptorblocker GPI 562 und den Thrombin-Inhibitor Hirudin
-eine intravitalmikroskopische Untersuchung**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Güler Sevilmis

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. C. Hammer

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Chr. Heeschen
Prof. Dr. W. Schramm
PD. Dr. U. Wintergeist**

**Mitbetreuung durch
den promovierten**

Mitarbeiter: Dr. med. vet. E. Thein

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2007

Inhaltsangabe	Seite
I. Einleitung:	
Xenotransplantation: Vergangenheit- Gegenwart- Zukunft	7-14
II. Material und Methoden: Allgemeine Bemerkungen	
2.1. Perfusionssystem	15-17
2.2. Perfusat	17-18
2.3. Perfusat	18
1. Präparation mit GPI 562	
2. Präparation mit Hirudin	
2.4. Evaluierung des Perfusionssystems	18-20
2.5. Versuchstiere	20
2.6. Präparation der Leber	21
2.7. Perfusionsvorgang	21-22
2.8. Versuchsgruppen	22
2.9. Makrohämodynamik: Portaler Druck	23
2.10. Intravitalmikroskopie (IVM)	
2.10.1. IVM-Technik	23-24
2.10.2. Mikrozirkulation der Leber	24-27
2.10.3. CAMAS : Analyse der Videosequenzen	27
2.10.3.1. Sinusoidale Perfusion, Sinusoidaler Perfusions-Index	28-30
2.10.3.2. Sinusoidaler Perfusionsindex	
A Zeitbezogener Index der sinusoidalen Perfusion	
B Gesamtindex der sinusoidalen Perfusion	
2.10.3.3. Blutflussgeschwindigkeit	
2.10.3.4. Durchmesser der Sinusoide	
2.10.3.5. Leukozyten-Zell-Interaktion	

2.11. Blutbild und Blutgasanalyse des Perfusats	30
2.12. Laboruntersuchungen des Perfusats	30
2.13. Gallefluss	31
2.14. Histologie	31
2.15. Statistik	31
III. Ergebnisse	
3.1. Evaluierung des Perfusionssystems	32
3.1.1. Anzahl der Erythrozyten	33
3.1.2. Anzahl der Leukozyten	33
3.1.3. Anzahl der Thrombozyten	34
3.1.4. Aktivierung der Leukozyten	35
3.1.5. Aktivierung der Thrombozyten	36
3.1.6. Komplement-Aktivierung	36-37
3.2. Makrohämodynamik	37-38
3.3. Mikrozirkulation	38
3.3.1. Intravitalmikroskopische Beobachtungen der Reperfusion	38-41
3.3.2. Sinusoidale Perfusion	42
3.2.3. Sinusoidaler Perfusionsindex	42-46
3.2.4.1. Sinusoidaler Perfusionsindex (zeitbezogen)	
3.2.4.2. Sinusoidaler Perfusionsindex (gesamt)	
3.3.4. Blutflussgeschwindigkeit	46-47
3.3.4.1. Blutflussgeschwindigkeit	
3.3.5. Durchmesser der Sinusoide	47
3.3.6. Intravitalmikroskopische Beobachtung der Leukozyten	48-49
Adhärente Leukozyten – sinusoidal	49
Rollende Leukozyten- sinusoidal	50-51

Fliessende Leukozyten- sinusoidal	51-52
Adhärente Leukozyten- postsinusoidal	53-54
Rollende Leukozyten- postsinusoidal	54-55
Fliessende Leukozyten- postsinusoidal	55
3.3 Blutbild des Perfusats	56-57
3.3.1. Leukozyten im Perfusat	
3.3.2. Thrombozyten im Perfusat	
3.4. Laboruntersuchungen des Perfusats	57-62
3.4.1. Aspartat-Amino-Transferase (GOT) im Serum	
3.4.2. Alanin-Amino-Transferase (GPT) im Serum	
3.4.3. Alkalische Phosphatase (APH) im Serum	
3.4.4. Laktat- Dehydrogenase (LDH) im Serum	
3.4.5. Freies Hämoglobin im Serum	
3.5. Gallefluss	62-63
3.6. Histologie	63-67
3.6.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
3.6.2. Acetat-Esterase-Färbung	
IV. Diskussion	
4.1. Einleitung	67
4.2. Diskussion der Methodik	68
4.2.1. Perfusionssystem Rattenleber/ Humanblut	68-69
4.2.2. Perfusionskreislauf	69
4.2.3. Perfusatpräparation	70
4.2.4. Intravitalmikroskopie	70

4.3. Diskussion der Ergebnisse	70-71
4.3.1. Makrohämodynamik	71
4.3.2. Mikrozirkulation	71-76
4.3.2.1. Mikrozirkulation unter dem Einfluss von GPI	
4.3.2.2. Mikrozirkulation unter dem Einfluss von Hirudin	
4.3.2.3. Räumliche Verteilung der Perfusionsstörung	
4.3.2.4. Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen	
4.3.3. Gallefluss	76
5. Zusammenfassung	77-78
6. Literaturverzeichnis	79-91
7. Abkürzungsverzeichnis	92-93
8. Danksagung	94
9. Lebenslauf	95-96

Einleitung:

Xenotransplantation: Vergangenheit-Gegenwart-Zukunft

Die Xenotransplantation wird definiert als die Transplantation von Organen, Geweben und Zellen zwischen verschiedenen Tier-Arten und wird heutzutage als eine neue Weiterentwicklung der Transplantationsmedizin angesehen. Die Idee der Xenotransplantation existierte schon vor der Ära der allogenen Transplantation. Die ersten Organtransplantationen, die zu Beginn des 20. Jahrhunderts experimentell durchgeführt wurden, waren Verpflanzungen von Tierorganen auf den Menschen. [39, 42].

Geschichte der Xenotransplantation:

Die Entwicklungen in der Chirurgie zu Beginn des 20. Jahrhunderts, insbesondere auf dem Gebiet der Gefässanastomosen, weckten Interesse an der Frage, ob durch Transplantationen von Organen die Heilung von Krankheiten möglich wäre.

Zu dieser Zeit war es undenkbar, dass jemals menschliche Organe für eine Transplantation zur Verfügung stehen würden. Ein Hirntodkonzept bestand damals noch nicht, womit die Entnahme von Organen aus Menschen ausgeschlossen war.

Dieser Mangel an menschlichen Spenderorganen führte zu den wissenschaftlichen Anstrengungen, Tierorgane auf den Menschen zu verpflanzen.

1906 führten Ullman und Jaboulay die ersten technisch erfolgreichen, vaskularisierten Transplantationen durch: Sie anastomosierten die Gefäße von Schweine- und Schafnieren mit Blutgefäßen von Menschen; jedoch ohne klinischen Erfolg [113]. Nach kurzzeitiger Funktion versagten die Xenotransplantate. Die Autoren erklärten sich dieses Versagen durch technische Probleme bei der Operation. Heute weiß man, dass der Grund hierfür in der hyperakuten xenogenen Abstoßungsreaktion (HXR) lag.

Mit dem Einzug der allogenen Nierentransplantation in die klinische Praxis in den frühen sechziger Jahren [83] stellte sich erneut die Frage nach alternativen Quellen für Organe.

Reemtsma und Starzl versuchten in einigen Fällen das Problem durch nicht-humane Primaten als Organspender zu lösen [83, 97]. Diese Transplantate versagten nicht primär, wie die von Ullman und Jaboulay transplantierten, sondern funktionierten teilweise sogar über Monate hinweg. Jedoch waren die Ergebnisse im grossen und ganzen nicht zufriedenstellend. Die Empfänger litten unter wiederholten Abstossungskrisen und Infektionen, an deren Folgen die Patienten auch verstarben.

Als dann Mitte der sechziger Jahre, nach der Etablierung von Transplantationsgesellschaften menschliche Organe in größerer Anzahl zur Verfügung standen, schwand das Interesse an der Xenotransplantation.

Nur noch vereinzelt wurden klinisch xenogene Transplantationen durchgeführt. 1970 transplantierte die Gruppe um Starzl eine Schimpansenleber auf ein 7 Monate altes Kind, das an einer angeborenen Gallengangsatresie litt und für das kein adäquates menschliches Organ gefunden werden konnte [36]. Der Patient verstarb 26 Stunden nach der Operation, ohne aus der Narkose wieder zu erwachen. 1985 sorgten Bailey und Mitarbeiter für Schlagzeilen, als sie ein Pavianherz auf ein Neugeborenes mit hypoplastischem Linksherzsyndrom orthotop transplantierten [8]. Zunächst war der postoperative Verlauf komplikationsarm. Die Patientin „Baby Fae“ erholte sich gut. Die Herzfunktion verschlechterte sich ab dem 14. Tag postoperativ und am 20. Tag verstarb das Kind an den Folgen der Transplantatabstossung.

1970 formulierte Calne sein Konzept der Konkordanz und Diskordanz bei xenogenen Transplantationen [18]. Auf der Beobachtung beruhend, dass bei manchen Spezieskombinationen fast immer eine hyperakute xenogene Abstossung (HXR) auftritt (z.B. Schwein/ Primaten), es bei anderen

Kombinationen (z.B. Pavian/ Mensch), jedoch fast nie zur HXR kommt, teilte er die Xenotransplantationen in zwei Gruppen ein.

Spezieskombinationen, bei denen die HXR nicht auftritt, nannte er „konkordant“, bei denen sie auftritt, nannte er „diskordant“.

Da die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der HXR mit Abnahme des zoologischen Verwandtschaftsgrades steigt, vermuteten Hammer, Chaussy und Brendel, dass genetische Faktoren bestehen müssen, die über das Auftreten einer HXR entscheiden [20].

Sie konnten zeigen, dass dieser genetisch determinierte Mechanismus in der Bildung von präformierten natürlichen Antikörper (pnAK) besteht. Diese pnAK wurden später quantitativ durch die Fixierung an Gewebeprobe von verschiedenen Tierarten nachgewiesen [37].

Solange die genetische Grundlage der Diskordanz nicht manipuliert werden konnte, erschien die HXR eine unüberwindbare Hürde für die klinische Anwendung der Xenotransplantation zu sein.

Ab den neunziger Jahren nahm das Interesse an der Xenotransplantation wieder zu. Die Gründe hierfür waren folgende:

1. Es wurde nach einem Ausweg aus dem immer dramatischer werdenden Mangel an Spenderorganen bei zunehmendem Erfolg der Allotransplantation gesucht.
2. Der immunologische Mechanismus der HXR und der molekulare Hintergrund wurde weitgehend entschlüsselt.

Der Pathomechanismus der HXR soll im folgenden kurz umrissen werden. Die HXR wird durch die Bindung von pnAK an die xenogenen Epitope des Endothels des xenogenen Organs ausgelöst [37]. Diese pnAK sind in jedem menschlichen Serum in unterschiedlicher Konzentration vorhanden und hauptsächlich gegen das Gal (1-3) Gal-Epitop gerichtet [89, 86]. Die pnAK aktivieren die Komplementkaskade über den klassischen und alternativen Weg und führen zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC). Normalerweise

sind Zellen im allogenen System durch membrangebundene Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA), z.B. decay accelerating factor (DAF, CD 55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) oder homologous restriction factor (HRF, CD 59) gegen Angriffe des körpereigenen Komplementsystems geschützt [55, 57, 100]. Der MAC kann die Zellmembran nicht schädigen, wenn RCA präsent sind.

Die RCA werden aber während einer HXR quantitativ erschöpft und bieten keinen Schutz mehr gegen artfremdes Komplement [2]. Im Falle einer klassischen Xenotransplantation sind die Zellen des xenogenen Transplantates dann dem humanen MAC schutzlos ausgeliefert. Die Zellmembranen werden geschädigt und die Endothelzellen aktiviert.

Durch diese Aktivierung verliert das Endothel seine antikoagulatorischen Eigenschaften [86]. Die Folge sind Störungen der Mikrozirkulation mit konsekutiven Zellschädigungen und Hämorrhagien, die in kürzester Zeit zum Vollbild der HXR führen, was dem Verlust des Organs gleichzusetzen ist [66, 76, 77].

Mit besserem Verständniss der HXR wurde eine Vielzahl von Anstrengungen unternommen, diesen Mechanismus zumindest zu verzögern. Es wurden verschiedene Antikoagulations-Mechanismen eingesetzt, z.B. der GP IIb/IIIa-Antagonist GPI 562, oder Hirudin, um dadurch eine adäquate Mikrozirkulation des Organs zu gewährleisten und somit Zellschädigungen und Hämorrhagien zu unterdrücken.

Diese Versuche waren zwar in-vitro bei der Unterdrückung der HXR erfolgreich, sind jedoch bei langfristigen klinischen Anwendungen nicht praktikabel [28, 29].

Nachdem realisiert worden war, dass nicht-humane Primaten niemals in ausreichender Anzahl für die klinische Anwendung der Xenotransplantation gezüchtet werden könnten, fokussierte sich das Interesse auf das Schwein als potentielle Organquelle [100]. Schweine haben eine kurze Reproduktionszeit,

können einfach auch als „Minipigs“ gezüchtet werden, so dass deren Organe in der Größe und Anatomie in etwa mit menschlichen Maßen übereinstimmen.

Gegenwart

Wie ist der Stand der Xenotransplantation in Jahre 2005? Welche der Visionen und Ideen konnten bis zum heutigen Tag verwirklicht werden? Es ist in der Tat gelungen, das Genom von Tieren derart zu modifizieren, dass diese menschliche RCA auf ihren Zellmembranen exprimieren [24]. Diese Proteine schützen die Zellen vor dem Angriff durch das menschliche Komplementsystem. Zunächst wurden diese Studien in vitro an Zellen und dann in Perfusionsmodellen mit transgenen Herzen [95] und Lebern [75] durchgeführt.

1998 wurden schliesslich human-DAF transgene Schweineherzen orthotop in Paviane transplantiert [95]. Von 10 Herzen versagten 5 innerhalb der ersten 18 Stunden, jedoch ohne histologische Zeichen einer HXR. Vier der restlichen Tiere überlebten bis zu 5 Tage. Das letzte Tier musste auf Grund einer Panzytopenie nach 9 Tagen bei normaler Herzfunktion euthanasiert werden. Diese Studie zeigte eine eindrucksvolle Verlängerung des Überlebens nach einer diskordanten Xenotransplantation, da die bisher längste Überlebenszeit von Herzen nicht transgener Schweine mit nur 18 Stunden in der Literatur angegeben wird [33].

Ebenfalls 1998 wurden human-DAF transgene Schweinenieren in zuvor beidseits nephrektomierte Cynomolgus-Affen transplantiert [100]. Die Überlebenszeit betrug im Median 13 Tage (Spanne: 6 bis 35 Tage).

Überraschenderweise trat jedoch auch in der Kontrollgruppe keine HXR auf (medianes Überleben 6,5 Tage).

Da die Tiere der transgenen Gruppe, die länger als 8 Tage überlebten, an einer deutlichen normochromen, normozytären Anämie litten, wird vermutet, daß das durch die Schweineniere produzierte porcine Erythropoetin die Erythropoese der Primaten nicht stimuliert [33]. Tatsächlich konnte in einer darauffolgenden Studie durch die Gabe von rekombinantem humanen Erythropoetin (rhEPO) die

Überlebenszeit bei fast normalem Blutbild auf bis zu 78 Tage verlängert werden [109].

Heute steht die Überlegung im Vordergrund transgene Xenotransplantate als Assist-Device einzusetzen [1]. Im Falle der Leber würde das heißen, dass das xenogene Organ extrakorporal an das Gefäßsystem des Patienten angeschlossen wird. Das Blut des Patienten wird durch die Schweineleber geleitet, wo es „entgiftet“ und metabolisiert wird. Dieses Prozedere soll es der Leber des Patienten erlauben, sich zum Beispiel von der Intoxikation zu erholen und damit die Zeit, bis ein passendes allogenes Organ gefunden wird, zu überbrücken. Über einen solchen Versuch wurde im Jahr 2000 bei Lebertransplantationen berichtet: Zwei Patienten mit terminalem, fulminantem Leberversagen konnten durch die extrakorporale Perfusion einer human-DAF und human HRF (CD 59) transgenen Schweineleber so lange stabilisiert werden, bis eine menschliche Spenderleber zur Transplantation zur Verfügung stand. Die Perfusionsdauer betrug 6,5 und 10 Stunden, bis die Allotransplantation durchgeführt werden konnte. Beide Patienten waren bei erscheinen des Artikels [57] (5 und 18 Monate nach der Lebertransplantation) noch am Leben.

Obwohl die Schweinelebern für zwei humane Komplementregulatoren transgen waren, wurden in der Histologie allerdings Hinweise auf Gewebeschäden gefunden: Fokale schwere Stauung der Sinusoide und Hämorrhagien, in manchen Abschnitten sogar eine Zerstörung der Lebermikroarchitektur. Zusätzlich bestand eine milde lymphozytäre und eine deutliche neutrophile Infiltration der Leber. Dieses Muster von Schäden steht in engem Zusammenhang mit Mikrozirkulationsstörungen. Die Präsentation von zwei humanen Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) auf den Membranen der Zellen scheint nicht ausreichend zu sein, um Störungen der Mikrozirkulation zu verhindern.

Zukunft:

Über die Zukunft der Xenotransplantation werden viele Spekulationen angestellt. Sie reichen von der Forderung nach einem absoluten Verbot der Xenotransplantationen [17, 22] bis hin zu Vorstellungen, dass jede größere Klinik über eine Art lebende „Organbank“ über die notwendige Anzahl von xenogenen Organen transgener Schweine verfügen sollte.

Nichtsdestotrotz wird die Zukunft der Xenotransplantation von folgenden Faktoren mitbestimmt:

Die Übertragung von humanpathogenen Mikroorganismen stellt eines der größten Risiken bei der Xenotransplantation dar. Während die meisten Mikroorganismen durch spezifiziert pathogenfreie Züchtung problemlos aus den Spendertieren eliminiert werden können, ist das bei den Herpesviren, den Circoviren und den porcinen endogenen Retroviren (PERVs) nicht so einfach, da sie entweder schlecht nachweisbar sind, über die Plazenta übertragen werden, oder wie die PERVs im Genom der Tiere verankert sind. 1997 konnte R. Weiss und Mitarbeiter zeigen, dass endogene Retroviren im Schweinegenom (PERV) in vitro menschliche Zellen infizieren können [76]. Um dieses Problem zu umgehen konnten 2002 PERV-freie Schweine-Stämme gezüchtet werden [12]. Abgesehen davon haben Denner und Mitarbeiter ausserdem hochsensitive molekularbiologische und immunologische Nachweismethoden für PERVs, aber auch für andere porcine Viren entwickelt [26, 81]. Die Seren von über 160 behandelten Patienten, bei denen zuvor eine geringe Menge an Inselzellen zur Behandlung von Diabetes sowie Schweinehaut zur Behandlung von Brandwunden transplantiert wurde, wurden auf eine PERV-Übertragung untersucht. In keinem Fall wurde eine Übertragung nachgewiesen. Die Ergebnisse korrelieren mit denen von präklinischen Studien, bei denen Schweinezellen, Gewebe und ganze Organe unter Immunsuppression auf Affen transplantiert wurden und auch keine Übertragung von PERV auf die Rezipienten beobachtet wurde. Auch bei Infektionsversuchen, bei denen Rhesusaffen, Schweinsaffen und Pavianen in hohen Dosen PERV unter

Immunsuppression appliziert wurde, konnte keine Virusübertragung festgestellt werden [26].

Ein weiteres Problem stellen Mikrozirkulationsstörungen dar. Diese können zur Schädigung und letztendlich zum Verlust des Xenotransplantates führen. Bisher wurde die Mikrozirkulation nur indirekt nach Beendigung der Perfusion oder Transplantation anhand der Histologie oder der Immunologie beurteilt [49]. Es gibt kaum Studien, die die Mikrozirkulation direkt während der Perfusion, also in dem Moment, in dem die pathologischen Prozesse stattfinden, beschreiben.

Ziel der Arbeit:

Das Ziel dieser Arbeit ist die Mikrozirkulation während xenogener Perfusion darzustellen und Störungen qualitativ und quantitativ zu erfassen.

Als zweiter Schritt soll dann der Einfluß der Hemmung des Koagulationssystems auf die Mikrozirkulation und damit die HXR untersucht werden. Zusätzlich soll die Leukozyten-Endothel-Interaktion während der xenogenen Perfusion analysiert werden. Um dies zu ermöglichen, verwendeten wir die Methode der Intravitalmikroskopie (IVM) mit Auflichtbeleuchtung, um die Mikrozirkulation der Leber sichtbar zu machen [58,66]. Erst wenn das Auftreten der Mikrozirkulationsstörungen vollständig verstanden ist und therapeutisch beeinflusst werden kann, wird es möglich sein, die Funktion von Xenotransplantaten über eine längere Zeit hinweg zu gewährleisten.

2. Material und Methoden:

2.1. Allgemeine Bemerkungen

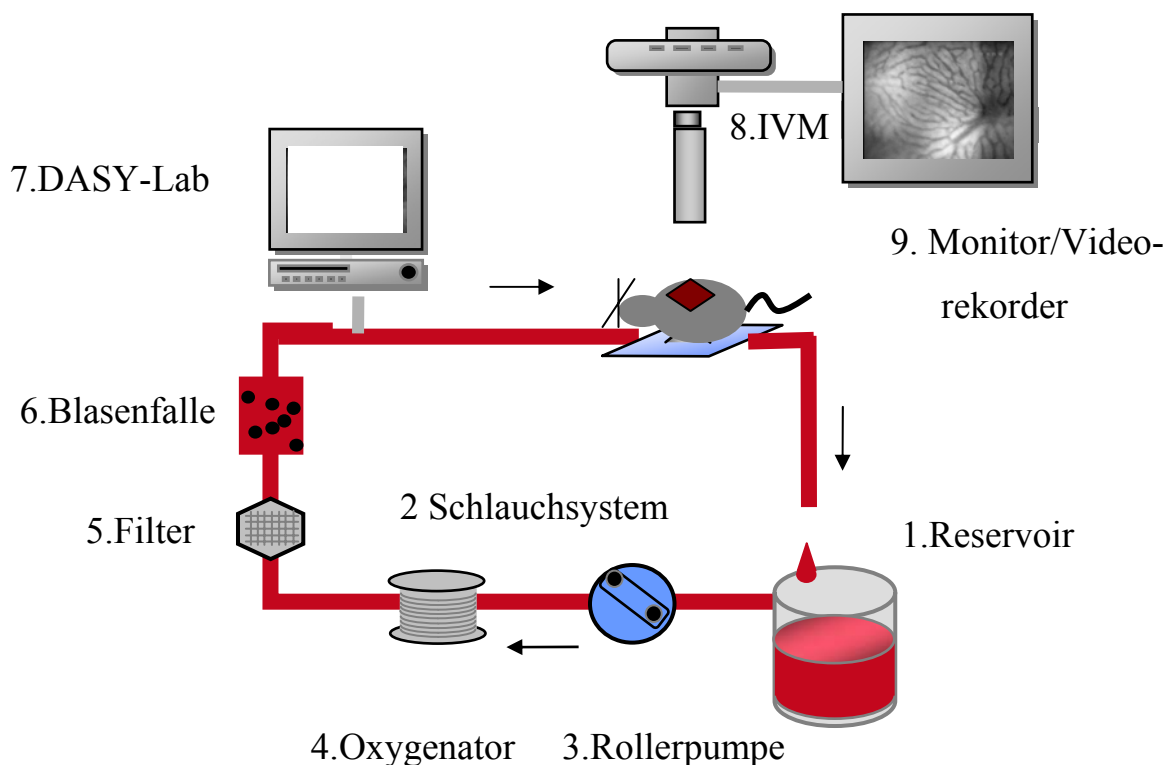
Der experimentelle Teil der vorliegenden Studie wurde in der Zeit von Januar 1999 bis Mai 2001 durchgeführt, nachdem die Versuche von der Regierung Oberbayern genehmigt worden waren.

Die Experimente bauen auf Versuche auf, die von Terajima et al., D. Seehofer et al., Diefenbeck et al.,... [66, 97] am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, München, Deutschland durchgeführt wurden. Alle Arbeiten befassen sich mit xenogener Perfusion von Rattenlebern.

2.2.Perfusionssystem

Aufbau des Perfusionssystems

(Schematische Darstellung)



(mod. nach Terajima)

Abb.1: Perfusionssystem mit Abbildung der Mikrozirkulation der Leber auf dem Monitor ,
 1. Blut-Reservoir; 2. Rollerpumpe; 3. Schlauchsystem; 4. Schlauchoxygenator; 5. Hämofilter;
 6. Blasenfalle; 7. Computerprogramm DASY-Lab; 8. Intravital-Mikroskop; 9. Monitor+
 Videorecorder

Das in dieser Studie verwendete Perfusionssystem (Abb.1) wurde von Arbeitsgruppen am Institut für Chirurgische Forschung (ICF) entwickelt und konstruiert. Es besteht aus einem Blutreservoir aus Polyethylen (Herstellung, ICF, Klinikum Großhadern, München, Deutschland) mit einem Füllvolumen von 50 ml. Das Reservoir steht in einem Wärmebad. Eine Pumpe, die an ein auf 40 °C beheiztes Wasserreservoir (Institut für chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, München, Deutschland) angeschlossen ist, leitet über Silikonschläuche permanent Wasser in das und aus dem Wärmebad, so dass das Wasser zirkuliert und eine Temperatur von 38°C aufrechterhalten wird.

Das Blut im Reservoir (1.) wird über eine Rollerpumpe (2.) (IPS, Ismatec SA, Zürich, Schweiz) in ein Schlauchsystem (3.) gepumpt. Anschließend passiert es einen Oxygenator (4. ICF) aus Aluminium. Der Oxygenator wurde speziell für diese Perfusionseinheit entwickelt. Er besteht aus einem dünnen, gasdurchlässigen Silikonschlauch (Detakta, Norderstedt: Wandstärke. 0,2 mm; Innendurchmesser 1 mm), der spiralförmig um einen Wärmekern gewickelt ist. Der Wärmekern ist mit einem Wasserbad verbunden, wodurch das Perfusat auf eine Temperatur von $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ erwärmt und gleichzeitig mit Sauerstoff aufgesättigt werden kann. Die Oxygenierung erfolgt durch die Zuleitung von reinem Sauerstoff in eine Plexiglasglocke, die den Wärmekern umschließt. Der Sauerstoff reichert sich in der Glocke an und diffundiert dem Sauerstoffgradienten folgend durch den Silikonschlauch. Die Gaskapazität des Schlauches am Oxygenator ist als Permeationskoeffizient angegeben (Tab 1) und beträgt für Sauerstoff $1400 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{h}$. Durch die Zuleitung von Kohlendioxid in die Glocke kann der pH-Wert des Perfusats gegebenenfalls korrigiert werden.

Nach der Passage durch den Schlauchoxygenator fließt das Blut durch einen Hämofilter (Swinnex 25, Milipore, Eschborn, Deutschland), der eine Porengröße von 60 µm hat, und dazu dient, Blutkoagel aus dem System zu eliminieren.

Die nun folgende Blasenfalle (5. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) fängt Gasblasen aus dem System und verhindert so das Einschwemmen von Luftblasen in die Leber und somit die Entwicklung einer Luftembolie.

Vor der eigentlichen Zuleitung in das Organ ist über einen Sensor (6. COMP DT-XX, Ohmeda, Murray Hill, NY, USA) und einen Dreiwegehahn ein Computer an das Schlauchsystem angeschlossen, dessen Software (DASY-Lab, Datalog, Mönchengladbach, Deutschland) während des gesamten Versuchszeitraumes die online-Aufzeichnung des Perfusionsdrucks erlaubt. Das Blut wird über einen Katheter in und aus dem Organ geleitet und fließt wieder zurück in das Reservoir. (1.)

Die Gesamtlänge des Silikonschlauchsystems beträgt 4,5 m mit einer Gesamtoberfläche von 168.0 cm². Der Schlauch im Oxygenator besteht aus einer Silikon-Kautschuk-Mischung mit einer Länge von 3,5m und einem Durchmesser von 2,0 mm.

Das Mindestvolumen des Perfusionssystems beträgt 7,0 ml.

2.3. Perfusat

Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 250 bis 300g wurden für die isogenen Gruppen als Blutspender verwendet. Bei einem höheren Körpergewicht entwickeln die Tiere eine Hypercholesterinämie, die einen nachteiligen Einfluss auf die Perfusion der Leber zeigt. Nach einer Äthernarkose mit Narkosen und anschließender medialer Laparotomie wurde die Aorta abdominalis der Tiere dargestellt, an der Bifurkation der Ae. Iliacae punktiert und das Blut in einer heparinisierten (10 IE/ml) Spritze gesammelt.

Durch Zugabe von Krebs-Henseleitpuffer wurde der Hämatokrit des Perfusates auf einen Wert von 30% ($\pm 2\%$) eingestellt ($V_{KH} = \frac{HKT_{Ist} - HKT_{Soll}}{HKT_{Soll}}$).

Durch die Senkung der Blut-Viskosität wurde die Perfusion des Organs und die Zelloyxygenierung verbessert [85].

Um Temperaturschwankungen im Perfusat zu vermeiden, wird das Blut nach der Blutabnahme im beheizten Reservoir gelagert und bis zur Perfusion bei einer Temperatur von 37,5°C gehalten.

2.3.1. Präparation mit GPI 562

In einer ersten Untersuchung wurde dem Perfusat der GP IIb/IIIa-Antagonist GPI 562 der Firma Novartis, Basel, Schweiz, in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Diese Konzentration hat sich in Kleintier-Versuchen als optimal erwiesen [15]. GPI 562 wird dem oben bereits beschriebenen Perfusat zugegeben.

2.3.2. Präparation mit Hirudin

In einer weiteren Versuchsreihe wird dem Perfusat der Thrombozyten-Aggregations-Inhibitor Hirudin zugegeben. Die Konzentration von 0,6 µg/ml hat sich in Transplantationsversuchen bewährt.

Nachdem das Perfusat mit GPI 562/ Hirudin präpariert wurde, zirkuliert das Blut 5 min bei 40 ml/min im Perfusionssystem. Damit wird eine optimale Mischung des Perfusates gewährleistet.

2.4 Evaluierung des Perfusionssystems

Um den Einfluß des Perfusionssystems auf das Perfusat und die darin enthaltenen Zellen zu untersuchen, wurden insgesamt 12 Experimente durchgeführt. Für die Evaluierung zirkulierte Humanblut des oben angegebenen Hämatokrits bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 35 ml/min 90 min lang im Perfusionssystem.

Bei sechs dieser Experimente wurde Heparin (25 U/ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) als Antikoagulanzen zugefügt, bei weiteren sechs Versuchen Citrat. Um den Einfluß des Perfusionssystems auf das Blut und die darin enthaltenen Zellen zu verifizieren wurde das System im Leerlauf, d.h. ohne Organ perfundiert.

Gruppe	Perfusat	Benutzung des Schlauchsystems	Dauer	Anzahl
1	xenogen + Heparin	neu	90	6
2	xenogen + Citrat	neu	90	6
3	xenogen	neu	120	3
4	xenogen	neu	240	3
5	xenogen	mehrmals		

Tab. 1: Perfusion des Systems ohne Leber

Bis auf Gruppe 5 wurde für jeden Versuchsansatz ein neues Schlauchsystem benutzt. Vor Beginn der Perfusion wurde das System 60 min lang mit physiologischer Kochsalz-Lösung gespült.

In beiden Versuchsgruppen wurde jeweils sechs verschiedenen menschlichen Blutspendern je 30 ml Blut abgenommen, so dass jeder der sechs Blutspender in beiden Gruppen jeweils einmal Blut spendete. Vor jeder Blutabnahme wurde eine Befragung der Blutspender hinsichtlich akuter oder chronischer Krankheiten durchgeführt. Die Blutproben für das Labor wurden aus dem Schlauchsystem via Dreiwegehahn zu folgenden Zeiten nach Beginn der Perfusion entnommen: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 und 90 min. Mit einem Zellzählgerät (AC T8, Coulter-Beckmann, Krefeld, Germany) wurden die weißen und roten Blutzellen, sowie die Thrombozyten gezählt und so der Verlust dieser Zellen im Laufe des Versuchs bestimmt.

Die Aktivierung von Thrombozyten wurde mittels FACS (Fluorescent Sorter, FACSort, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), durch die Quantifizierung der Expression von CD 62P erfasst.

Dieselbe Methode wurde zur Bestimmung der Leukozyten-Aktivierung über die Messung der Bindung von markierten Antikörpern an CD62L (TQ1, Coulter-Beckman, Krefeld) und an CD11b durchgeführt.

Die Aktivierung des Komplementsystems wurde durch die Eruiierung der Serumspiegel der Komplementfaktoren C3c (Alternative Komplement-aktivierung) und des Faktors C4 (Klassische Komplement-aktivierung) per Immunoassay zu den Zeitpunkten 0, 1, 5, 15, 30, 60 und 90 Minuten nach Beginn der Perfusion gemessen.

Nach jedem Versuch wurde das Perfusionssystem in seine Einzelteile zerlegt. Die einzelnen Bestandteile wurden erst vorsichtig mit Pufferlösung gespült, um das restliche Perfusat auszuwaschen und anschließend mit 50 ml Puffer bei hohem Druck gespült. Die Spüllösung wurde aufgefangen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und ein Zytopräparat angefertigt. Diese Prozedur wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob und in welchen Abschnitten des Systems Zellen an die künstlichen Oberflächen des Perfusionssystems adhäreren.

In drei weiteren Versuchen wurde das Perfusionssystem nach einer Perfusionsdauer von 90 min und anschliessender einstündiger Spülung mit Antiseptikum (2%, Antiseptica, chem.-pharm. Produkte, Pulheim) und weiterer Spülung mit pysiologischer Kochsalzlösung, wiederverwendet. [102]

2.5. Versuchstiere

Für die Perfusionsversuche wurden die Lebern von männlichen Sprague-Dawley Ratten (SD) (Charles River Wiga, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 215-230 g verwendet. SD-Ratten mit einem Körpergewicht von 250-350 g dienten als Blutspender. Die Tiere erhielten vor dem Versuch Fertigfutter sowie Wasser ad libidum.

2.6. Präparation der Leber

Nachdem die Tiere mit Äther narkotisiert und mit Atropin prämediziert wurden, wurde die Narkose mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (60 mg/kg KG: Nembutal, CEVA, Hannover) vertieft. Es erfolgte eine mediane Laparotomie, wobei ein zweiter Schnitt entlang des Rippenbogens die vollständige Eröffnung des Abdomens ermöglichte. Die Leber wurde nach kranial mobilisiert und mit einer Klarsichtfolie zum Schutz vor Austrocknung abgedeckt. Der Ductus choledochus wurde freipräpariert und mit einem Polyethylenkatheter, Innendurchmesser: 1,7 mm kanüliert und die Galle in 15 minütigen Abständen in einer Eppendorfküvette gesammelt. Nach der Ligatur der V. lienalis und der V. gastromentalis wurde die Ratte auf dem Objektisch des Intravitalmikroskopes positioniert. Nach einer Injektion von 200 IE Heparin in die Vena dorsalis profunda penis wurde die V. portae und die V. cava inferior dargestellt und jeweils ein spitz zugeschnittener Silikonkatheter eingeführt. Es erfolgte anschliessend die Euthanasie des Tieres durch die Eröffnung des Thorax. Dieser Katheter diente im folgenden als Zu- und Abfluß für die Ringerlactatlösung und anschließend für das Perfusat. Die Leber wurde nun über die V. portae mit 40 ml 4°C kalter Ringer-Lactat-Lösung blutleer gespült. Es schloss sich die Auslagerung des linken Leberlappens auf eine spezielle Bühne an, wobei versucht wurde eine möglichst plane Oberfläche des Leberlappens zu schaffen. Die Leber wurde nun an das Perfusionssystem angeschlossen und über die V. portae flußkonstant mit isogenem bzw. xenogenem Blut perfundiert.

2.7. Perfusionsvorgang

Über eine Zeit von 90 min wurden die Organe bei einer physiologischen, volumenkonstanten Flussrate von $1,15 \pm 0,1$ ml/min/g Leber in dem beschriebenen rezirkulierenden System perfundiert. Nach der Passage der Blasenfalle wurden zu den Zeiten: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 Minuten, Proben aus dem Perfusat entnommen und die Sauerstoffsättigung durch eine Blutgasanalyse (BGA) bestimmt. Durch die steuerbare Zuleitung von Sauerstoff zum Oxygenator wurde der paO_2 des Perfusates stets über 95 % gehalten. Auch der pH-Wert des Perfusates wurde mittels der BGA gemessen und auf einem physiologischen Bereich zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt. Dies erfolgte entweder durch die Zuleitung von Kohlendioxid zum Oxygenator oder durch die Zugabe von Natriumbicarbonat ($Na_2(CO_3)$) zum Perfusat. Das Perfusat wurde auf $37,0 \pm 0,5^\circ$ Celsius durch das mit dem Wärmekern im Oxygenator verbundene, regulierbare Wasserbad erwärmt.

2.8. Gruppeneinteilung der Versuche (mit Organ)

Gruppe	Perfusion	Blutspender	Anzahl
A	isogen	Ratte	6
B	isogen + GPI 562	Ratte	6
C	isogen + Hirudin	Ratte	6
D	xenogen	Mensch	6
E	xenogen + GPI 562	Mensch	6
F	xenogen + Hirudin	Mensch	6

Tab 2: Versuchsgruppen: Jeweils drei isogene (A, B, C) und drei xenogene (D, E, F) Gruppen wurden untersucht. Gruppe B und E wurde GPI 562 in einer Konzentration von 5 μ g/ml; Gruppe C und F Hirudin in einer Konzentration von 0,6 μ G/ml zugegeben.

Unsere Studie umfaßt sechs Versuchsgruppen à sechs Sprague-Dawley-Ratten (Tab.1). Das Blut in der isogen perfundierten Gruppe stammt von Spendertieren des gleichen Stammes mit einem Körpergewicht von 250 bis 350 g. Die Versuchstiere selbst haben ein Gewicht von 200 bis 230 g. Dem Perfusat der xenogenen Versuchsgruppe (menschliches Blut) wurde der GP IIb/IIIa-Antagonist GPI 562 in einer Konzentration von 5 µg/ml, bzw. Hirudin in einer Konzentration von 0,6 µg/ml zugegeben.

Bei den Humanblutspendern wurde darauf Wert gelegt, dass in jeder der drei xenogen perfundierten Gruppen die selben Personen Blut spendeten, da auf diese Art und Weise ein möglicher Einfluß des Spenderblutes auf die Versuchsergebnisse minimiert wird. Es spendeten also sechs verschiedene gesunde Personen in jeder der beiden xenogenen Versuchsgruppen jeweils einmal Blut.

2.9. Makrohämodynamik: Portaler Druck

Als Parameter der Makrohämodynamik der Leber wurde der Druck in der Vena porta gemessen. Er wurde kontinuierlich über einen Drucksensor, der an das Perfusionssystem angeschlossen war, mit Hilfe von DASY-Lab aufgezeichnet.

2.10. Intravitalmikroskopie (IVM)

2.10.1. IVM-Technik

Die IVM ermöglicht die direkte Darstellung der Mikrozirkulation der Leber während der Perfusion. Perfusionsausfälle können erkannt und quantifiziert, sowie die Leukozyten-Endothel-Interaktion analysiert werden. Um eine möglichst plane Oberfläche der Leber für die IVM zu erreichen, wurde aus Plastilin eine Negativschale geformt, die individuell jeweils die Form der Auflage der Leber darstellte. Diese wurde auf eine eigens für diese Zwecke hergestellte Bühne (ICF) gelagert. Die Leber wurde anschliessend um 180° nach kranial gekippt und in diese Schale gelegt. Ein gerasterter Objektträger, der in

nummerierte Felder unterteilt war, wurde auf die Leber gelegt. Die Unterseite des linken Leberlappens wurde dann mit einem Aufricht-Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Deutschland) während des Perfusionsvorgangs untersucht. Zwei optische Filter waren zur Visualisierung der Fluoreszenzfarbstoffe nötig: 450-490/>515 nm (Exzitation/Emission) für Natrium-Fluoreszein und 530-560 nm für Rhodamin 6G. Ein Wasserimmersionsobjektiv (25-fache Vergrößerung) ermöglichte die Analyse der Mikrozirkulation. Die Bilder der Mikrozirkulation der Leber wurden durch eine CCD-Kamera (Pieper FK 6990, Mellingen, Schweiz) auf einen Monitor (Sony Triniton PVM 2043, Japan) übertragen und von einem sVHS-Videorecorder (Panasonic 7350, Japan) aufgezeichnet. Zwischen Kamera und Monitor wurde ein Video-Zeitgeber geschaltet. Dieser ermöglichte später die zeitbezogene Auswertung der Videosequenzen. Während der Perfusion wurden wiederholt, in zwei Durchgängen, je zehn Leberfelder und zehn postsinusoidale Venolen zu verschiedenen Zeitpunkten systematisch aufgesucht. Die Felder, die ausgewählt wurden, bildeten insgesamt eine z-förmige Struktur auf dem gerasterten Objektträger, so dass alle perfusionsrelevanten Bereiche der Leber abgedeckt wurden. Die Felder wurden in 800-facher Vergrößerung über je 30 Sekunden beobachtet und gleichzeitig auf Videobänder aufgezeichnet. Dabei wurden abwechselnd beide Filter verwendet, um sowohl Erythrozyten und Plasmafluss als auch das Verhalten der Leukozyten analysieren zu können.

2.10.2 Mikrozirkulation der Leber

Die mikrozirkulatorische Grundeinheit der Leber ist der Azinus. Der Leberazinus ist ein definierter Parenchymabschnitt, der durch eine terminale portale Venole (TpV) und eine terminale hepatische Arteriole (ThA) versorgt wird. Diese verlaufen parallel nebeneinander an der Grenze zweier sechseckiger Leberläppchen (Lobuli). Aus diesen beiden Gefäßen werden die Sinusoide mit Blut gespeist, die dann in die terminalen hepatischen Venolen (ThV) münden. Sechs Azini zusammen bilden ein Leberläppchen (Lobulus), in dessen Mitte

sich eine terminale hepatische Venole befindet. Die terminale hepatische Venole wird als Zentralvene bezeichnet, der Lobulus folglich als Zentralvenenläppchen.

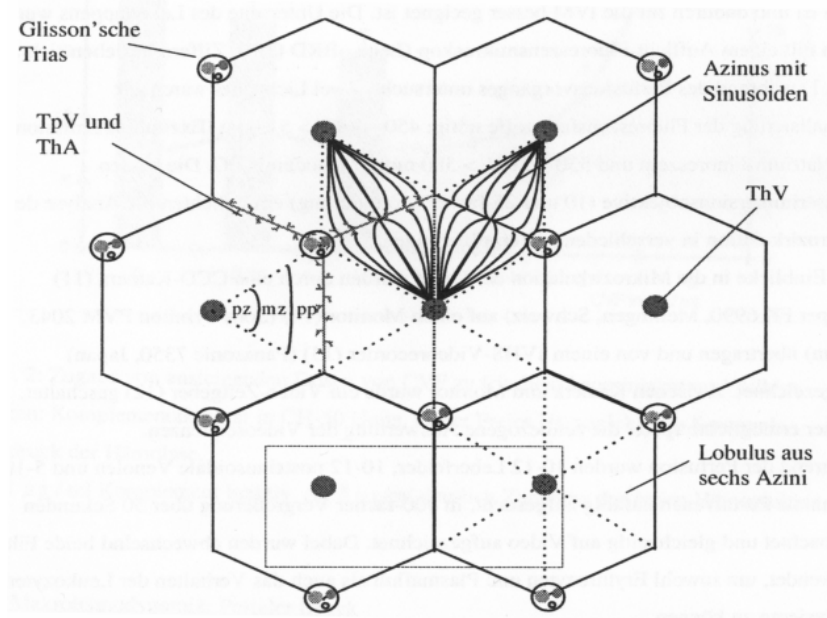


Abb. 2 : Schematischer Querschnitt durch das Lebergewebe. Ein Sechseck entspricht einem Lobulus, in dessen Mitte eine terminale hepatische Venole liegt und der in sechs Azini eingeteilt werden kann. Die Glissonsche Trias besteht aus jeweils einem Ast der Pfortader, der Arteria hepatica und des Gallengangsystems. Aus der Glissonschen Trias zweigen recht-winklig die terminale portale Venole (TpV) und die terminale hepatische Arteriole (ThA) ab.

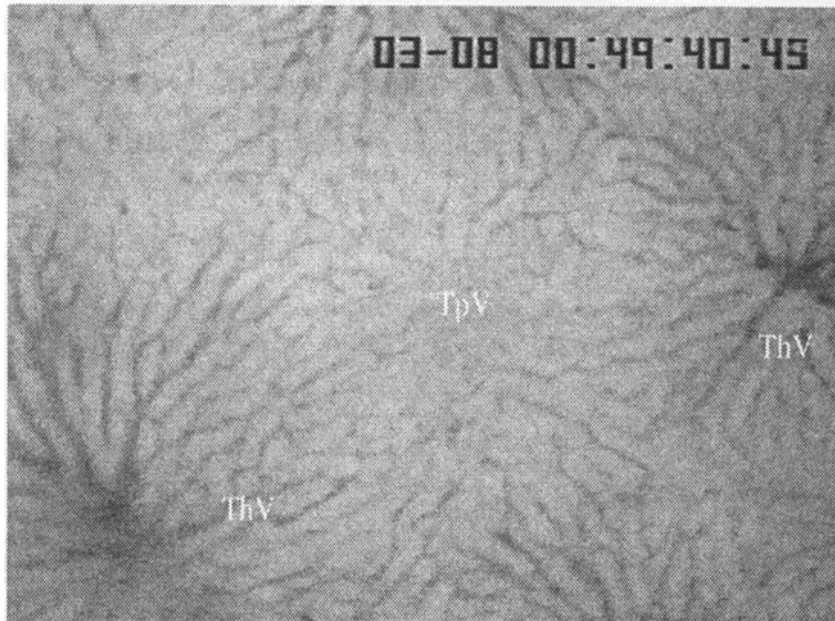


Abb. 3 : Intravitalmikroskopische Aufnahme zweier Leberazini mit terminaler portaler Venole (TpV) und zwei terminalen hepatischen Venolen (ThV). Sinusoide entspringen von der TpV und ziehen zu den ThV. Isogene Perfusion der Gruppe A nach 49 Minuten.

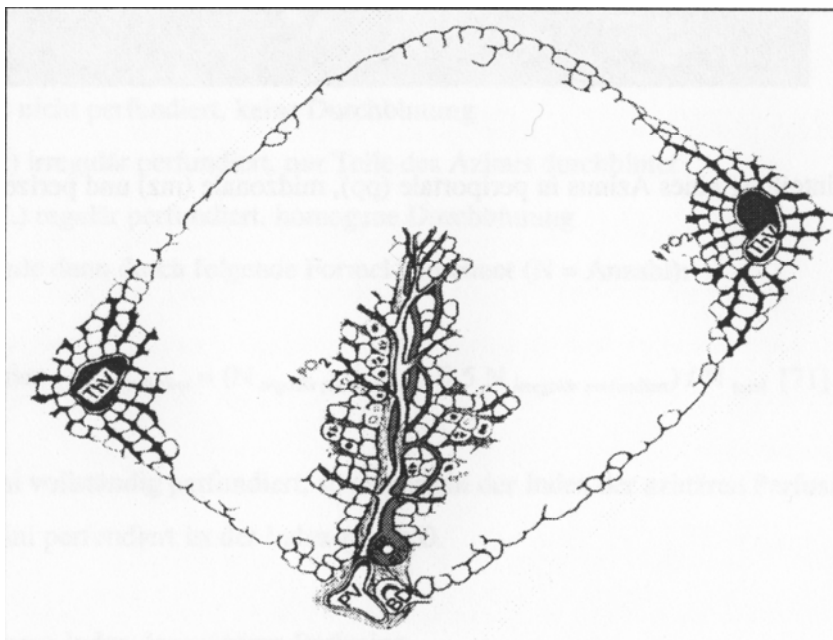


Abb. 4 : Schematische Zeichnung eines Azinus, entsprechend der vorhergehenden Abbildung. TpV: terminale portale Venole; ThV: Terminale hepatische Venole.

Der Leberazinus wird in drei Abschnitte eingeteilt: Die portale (pp) Zone befindet sich um die terminale portale Venole herum, die perizentrale (pz) Zone um die terminale hepatische Venole. Zwischen den beiden Zonen liegt der midzonale (mz) Bereich. Diese Einteilung ist analog zu der von Rappaport [82], wobei dieser die periportale Zone als Zone 1, die midzonale als Zone 2 und die perizentrale als Zone 3 bezeichnet.

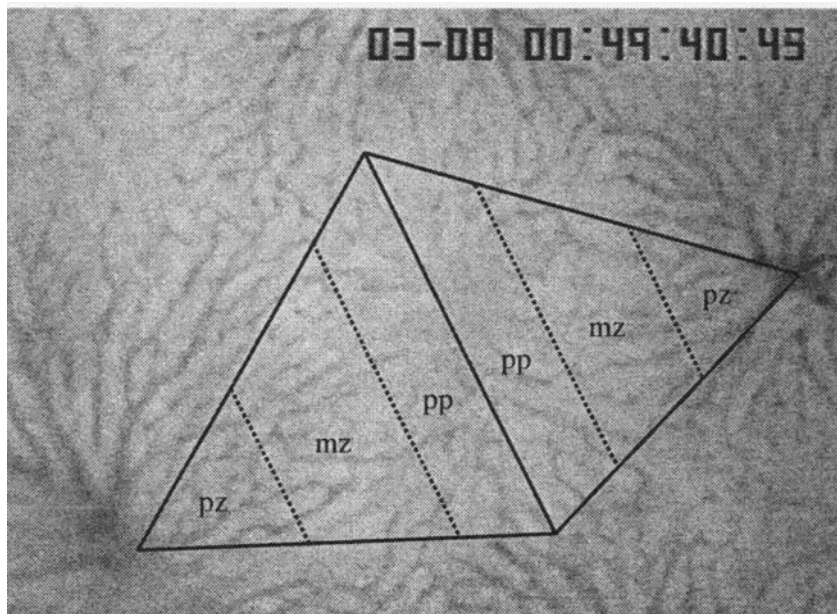


Abb.5 : Einteilung eines Azinus in periportale (pp), midzonale (mz) und perizentrale (pz) Zonen

2.10.3 Analyse der Videosequenzen

Nach Abschluss der Hämoperfusion wurden mittels des Computerprogrammes CAMAS (Computer Assisted Microcirculation Analysis System, CAMAS, Dr Zeintl, Heidelberg, Deutschland) folgende Parameter der Mikrozirkulation der Videoaufzeichnungen bestimmt:

1. Sinusoidale Perfusion
2. Sinusoidaler Perfusionsindex
 - A. Zeitbezogener Index der sinusoidalen Perfusion
 - B. Gesamtindex der sinusoidalen Perfusion

3. Blutflussgeschwindigkeit (Velocity) – sinusoidal / postsinusoidal
4. Durchmesser der Sinusoide
5. Leukozyten-Zell-Interaktion:
Anzahl der adhärennten, rollenden und freifliessenden Leukozyten
-Sinusoidal
-Postsinusoidal

1. Sinusoidale Perfusion

Zur Bestimmung der sinusoidalen Perfusion wurde nach der Applikation von Natrium-Fluoreszein zur Plasmakontrastierung die Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide in 5-7 Azini gezählt und als prozentualer Anteil (%) aller sichtbaren Sinusoide innerhalb eines Azinus angegeben. Die sinusoidale Perfusion wurde periportal, midzonal und perizentral entsprechend der zonalen Gliederung des Azinus analysiert.

2. Sinusoidaler Perfusionsindex

Der sinusoidale Perfusionsindex ermöglicht einen Überblick über den Perfusionsstatus der Leber. Zu seiner Bestimmung wurden die Sinusoide in zwei Kategorien eingeteilt:

- I. nicht perfundiert, keine Durchblutung
- II. regulär perfundiert, homogene Durchblutung

Der Index wurde dann durch folgende Formel berechnet (N= Anzahl):

$$\text{Index}_{\text{sinusoidale Perfusion}} = (N_{\text{regulär perfundiert}} + 0,5 N_{\text{nicht perfundiert}} / N_{\text{total}})$$

Sind alle Sinusoide vollständig perfundiert, so entspricht der Index der sinusoidalen Perfusion 1; ist keiner der Sinusoiden vollständig perfundiert, ist der Index gleich 0.

2.a Zeitbezogener Index der sinusoidalen Perfusion

Um den zeitlichen Verlauf des Index der sinusoidalen Perfusion verfolgen zu können, wurden dieselben Sinusoide in jeweils zwei Zeitintervallen beurteilt:

1. Durchgang: 0.-45. Minute,
2. Durchgang: 45.-90. Minute nach Reperfusion.

In jedem Zeitintervall wurde der Mittelwert gebildet und als Index der sinusoidalen Perfusion (zeitbezogen) bezeichnet.

2.b Gesamtindex der sinusoidalen Perfusion

Dieser Index stellt den Mittelwert aus den beiden Gruppen dar.

Dadurch kann jeder Gruppe ein Wert zugeordnet werden, der einen Überblick über den Perfusionszustand der Leber während der gesamten Perfusionsdauer zulässt.

3. Blutflussgeschwindigkeit (Velocity)

Die Fliessgeschwindigkeit von Erythrozyten in den postsinusoidalen Venolen wurde in mm/s bestimmt (7-10 Einzelmessungen). Dabei wurde mit Hilfe von Camas die von einer roten Blutzelle zurückgelegte Wegstrecke Δs bestimmt und über $v = \Delta s / \Delta t$ die entsprechende Geschwindigkeit in mm/s gemessen.

4. Durchmesser der Sinusoide

Das Computerprogramm CAMAS bietet die Möglichkeit offline auf Standbildern der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen, Distanzen zu messen. Diese Möglichkeit wurde zur Ermittlung der Durchmesser der Sinusoide genutzt und in μm angegeben.

5. Leukozyten-Zell-Interaktion

Die im Perfusat enthaltenen Leukozyten wurden mit Rhodamin 6G angefärbt und konnten so als hell fluoreszierende Zellen beobachtet werden.

Zellen, die sich in den Sinusoiden nicht fortbewegten, sondern über den Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden pro Azinus am Gefäßendothel stagnierten, wurden „adhärente Leukozyten“, (Sticker), genannt.

Leukozyten, die sich innerhalb dieses Zeitraumes langsam am Gefäßendothel fortbewegten, wurden als „rollende Leukozyten“ bezeichnet, (Roller).

Die Zahl der fließenden Leukozyten ist als Anzahl an Leukozyten definiert, die pro 30 Sekunden einen Lobulus frei passieren. Sie dürfen nicht länger als eine Sekunde am Endothel anlagern, da sie sonst den adhären Leukozyten zugeordnet werden. Die Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen wurden nach demselben Verfahren eingeteilt.

2.11. Blutbild und Blutgasanalyse (BGA) des Perfusats

Zu den Zeitpunkten: 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 min nach Reperfusion der Leber wurden vor der Wiedertzuleitung des Perfusates in das Reservoir, Blutproben aus dem Perfusionskreislauf entnommen. Mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Model T450, Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland) wurden in diesen Proben jeweils die Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und der Hämatokrit bestimmt. Das Blutgasanalyse-Gerät (Blutgas-System 348, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) ermöglichte die Messung der Sauerstoffsättigung (SaO_2) des Perfusats, des Sauerstoffpartialdrucks (paO_2), des Kohlendioxidpartialdrucks (paCO_2) und des pH-Wertes.

2.12. Laboruntersuchungen des Perfusats

Die Perfusatproben wurden zentrifugiert (Zentifuge Rotanta/ S, Hettich, Tuttlingen, Deutschland), das Serum abpipettiert und bei -70°C aufbewahrt. Mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern wurden folgende Enzyme bestimmt: Aspartat-Amino-Transferase (GOT), Alanin-Amino-Transferase (GPT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Alkalische Phosphatase (APH).

2.13. Gallefluss

Als weiterer Indikator der Leberfunktion wurde der Gallefluss gemessen. Ein Katheter, der in den Ductus choledochus eingebracht wurde, leitete die Galle, in je 15 minütigen Intervallen nach Reperfusion, in eine Eppendorfküvette. Der basale Gallefluss wurde über 15 Minuten in vivo bestimmt. Die Messung wurde in Mikroliter Galle pro Gramm Leber-Feuchtgewicht und Minute angegeben.

2.14. Histologie

Nach Beendigung der Reperfusion wurde die Leber aus dem System entnommen und gewogen. Zur histologischen Aufbereitung wurden aus verschiedenen Gebieten der Leber (portalnah, peripher) Proben gesammelt und in Paraformaldehyd gelagert. Die Proben wurden anschliessend in Paraffin eingebettet und in 3-4 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Färbung erfolgte routinemässig in Hämatoxylin-Eosin. Zusätzlich wurden Schnitte mit Acetatesterase gefärbt, um die Leukozyten zu markieren (ICF).

2.15. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (ME) ± Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Sämtliche statistische Analysen wurden unter Verwendung des Software Pakets Sigma StatTM (Jandel Corporation, St Rafael, CA, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-Rank-Sum-test auf statistische Unterschiede geprüft. Unterschiede wurden bei einem $p < 0,005$ als signifikant angesehen. Anschliessend wurden die Ergebnisse im IBE, Klinikum Grosshadern, München mittels des Programmes SAS Procedures Guise, Version 6, Third Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) noch einmal berechnet und bestätigt.

III. Ergebnisse: 3.1. Evaluierung

Zellen	Antikoagulant	n zur 0. Min.	n zur 90. Min	Differenz (%)
Erythrozyten	Heparin	$3,3 \times 10^6$	$3,29 \times 10^6$	0,3
	Citrat	$3,1 \times 10^6$	$3,01 \times 10^6$	2,9
Leukozyten	Heparin	$4,6 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	4,3
	Citrat	$3,8 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	2,6
Thrombozyten	Heparin	$133,8 \times 10^3$	108×10^3	19,3
	Citrat	$148,7 \times 10^3$	$126,7 \times 10^3$	14,3

Tab.2 : Kein signifikanter Verlust der Anzahl von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten im Perfusat, weder mit Heparin, noch mit Citrat als Antikoagulant. Es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Anzahl der Zellen ist jeweils vor Beginn der Perfusion bei 0 Minuten, und am Ende der Perfusion, in der 90. Minute aufgeführt

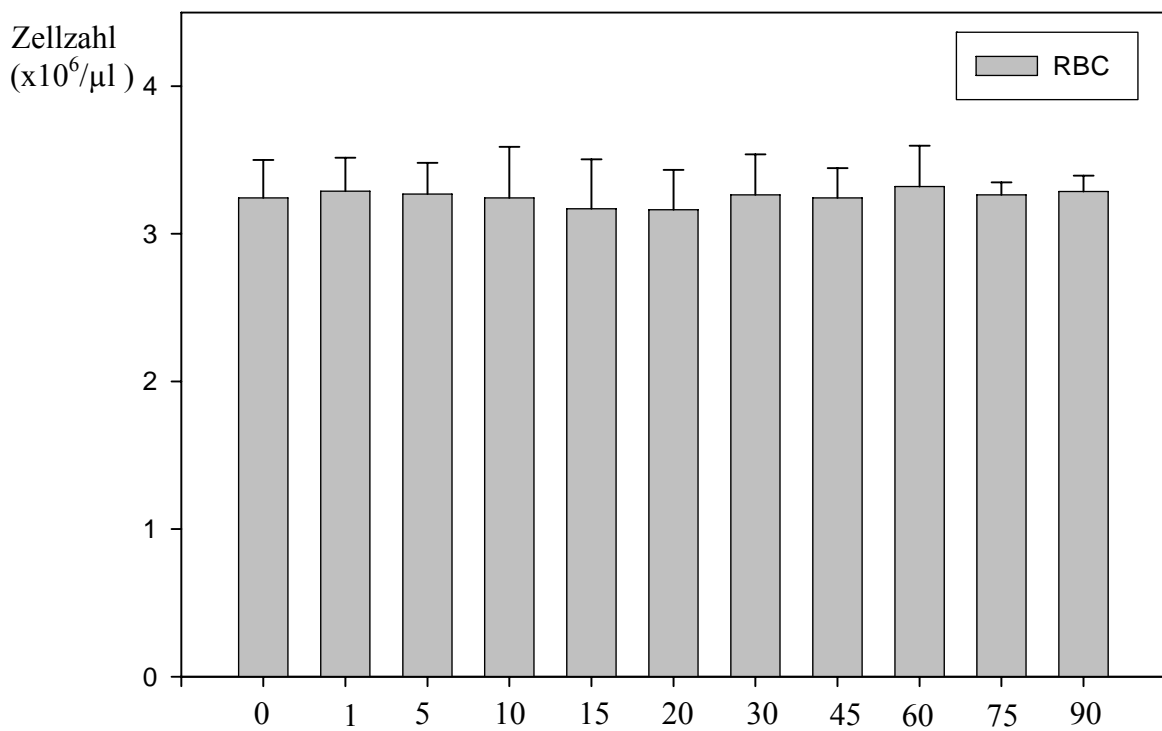


Abb. 1: Erythrozytenanzahl im Perfusat.

Meßzeitpunkte (min)

3.1.1. Anzahl der Erythrozyten

Die Anzahl der Erythrozyten zeigte während des gesamten Versuchszeitraumes keine signifikanten Unterschiede und blieb auf annähernd demselben Niveau.

3.1.2. Anzahl der Leukozyten

Die Leukozyten-Anzahl lag zu Beginn der Evaluierungsversuche bei 4.02×10^3 / μl ($\pm 0,73 \times 10^3$) und bei 4.05×10^3 / μl ($\pm 0,74 \times 10^3$) nach der Perfusion. Der niedrigste Wert lag bei 3.96×10^3 / μl ($\pm 0,81 \times 10^3$) nach 60 Minuten Perfusion. Demzufolge blieb die Anzahl der Leukozyten während des gesamten Versuchszeitraumes unverändert.

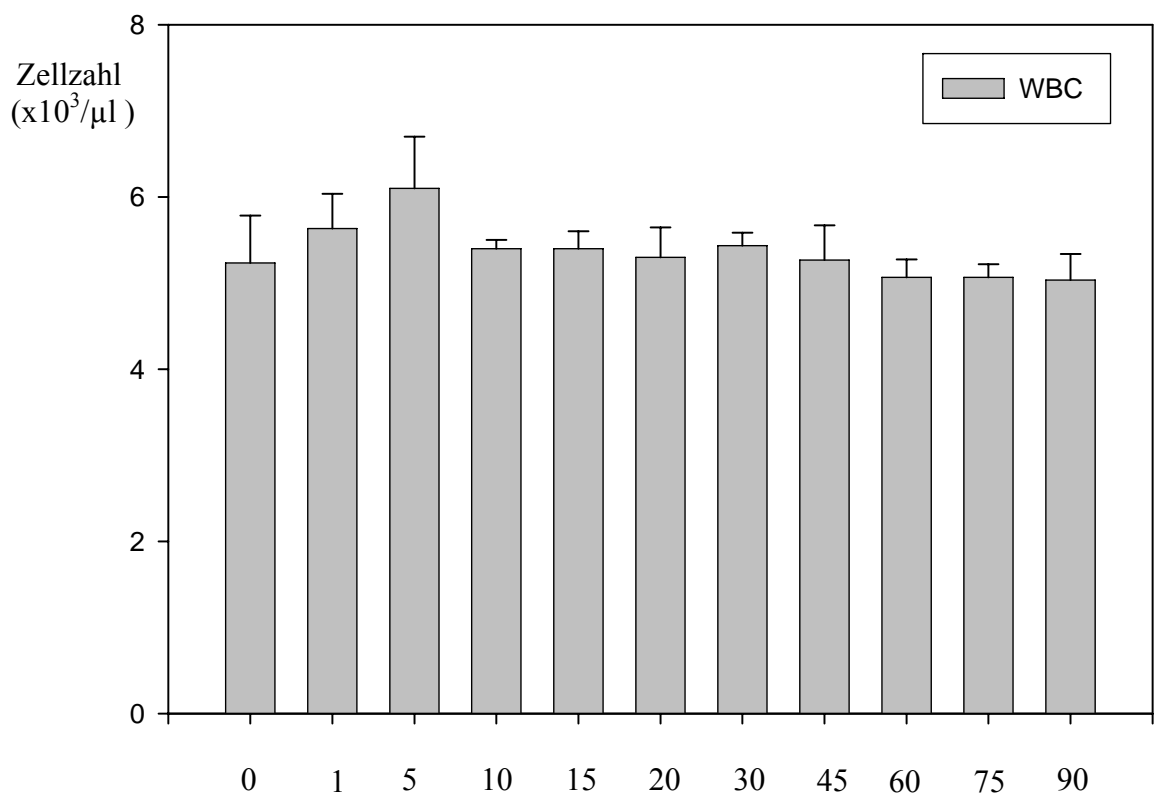


Abb. 2: Leukozytenanzahl im Perfusat

Meßzeitpunkte (min)

3.1.3. Anzahl der Thrombozyten

Die Anzahl der Thrombozyten liegt zu Beginn der Perfusion bei $148.67 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ($\pm 27.6 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 0. Minute) und sinkt gegen Ende des Versuchszeitraumes bis zu $126.67 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ($\pm 24.51 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 90. Minute) ab. Es wurden jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Änderungen der Anzahl an Thrombozyten festgestellt.

Am Ende dieses Versuches wurde das Perfusionssystem gespült, die Spüllösung aufgefangen und mikroskopiert.

In der Spüllösung konnten weder Erythrozyten, noch Leukozyten oder Thrombozyten nachgewiesen werden. Auch ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Versuchen, die mit zwei unterschiedlichen Antikoagulantien, Heparin/ Citrat durchgeführt wurden.

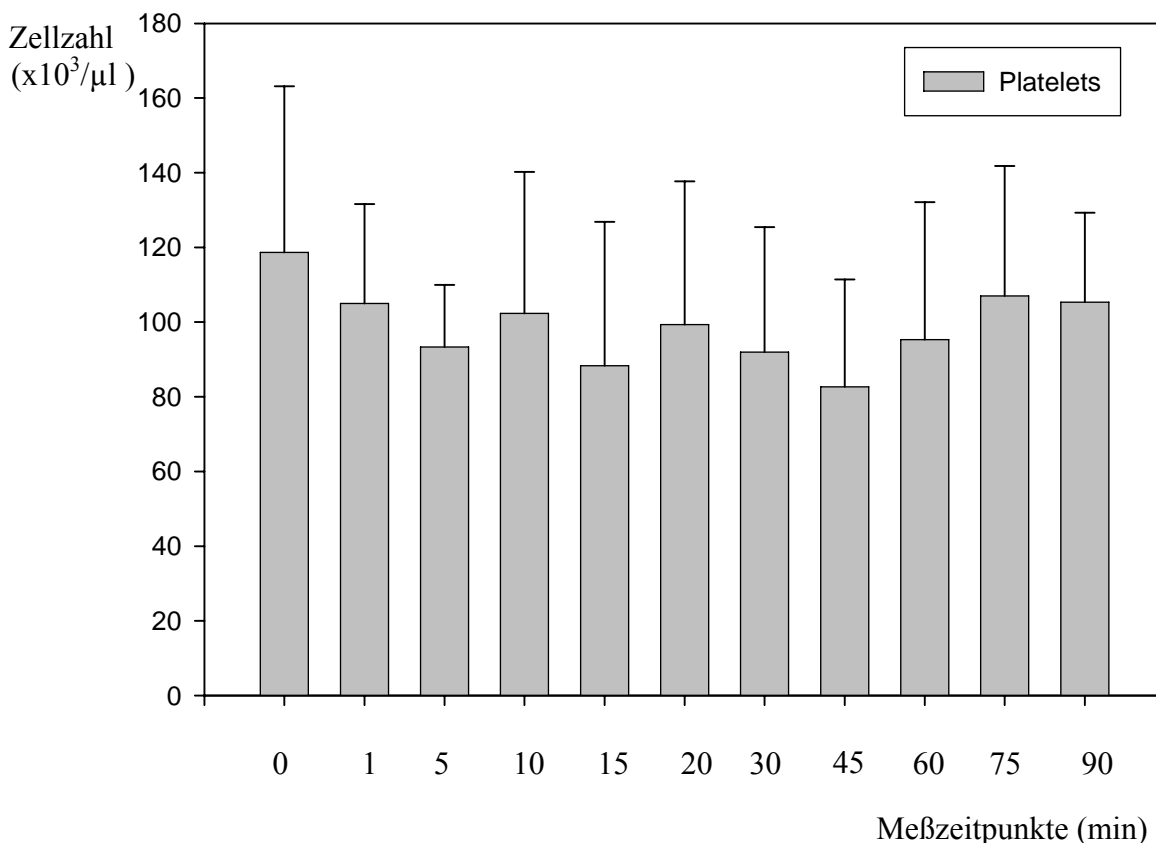


Abb. 3: Thrombozytenanzahl im Perfusat.

3.1.4. Aktivierung der Leukozyten

Die Aktivierung der Leukozyten erfolgte durch die Messung der Expression von CD62L und CD 11b mit Hilfe des Fluorescent Sorter. Über den Versuchszeitraum von 90 min treten keine signifikanten Veränderungen auf.

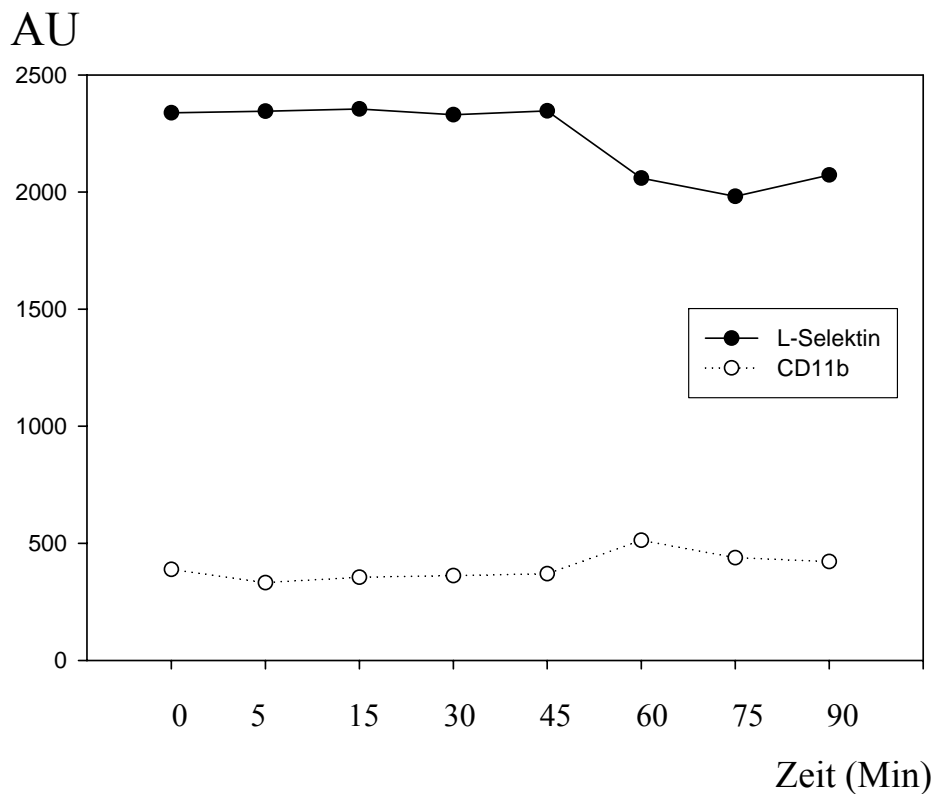


Abb. 4: Auf der Ordinate ist die Intensität der Fluoreszenz in Arbitrary Units (AU) angetragen. Auf der Abszisse liegen die einzelnen Messzeitpunkte. Über einen Zeitraum von 15 min verändert sich die Aktivität beider Moleküle so gut wie überhaupt nicht. Ab der 15 min kündigt ein leichter Abfall von CD62L (L-Selektin) und ein gleichzeitiger Anstieg von CD 11b eine möglicherweise beginnende Aktivierung an. Jedoch erreicht diese Entwicklung auch bis zur 90. min des Versuchszeitraumes keine Signifikanz.

3.1.5. Aktivierung der Thrombozyten

Die Messung der Aktivität von Thrombozyten erfolgte durch die FACS-Analyse. Hierbei wurde die Menge Antikörper gemessen, die gegen das CD62P-Antigen gerichtet sind, die auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten exprimiert werden.

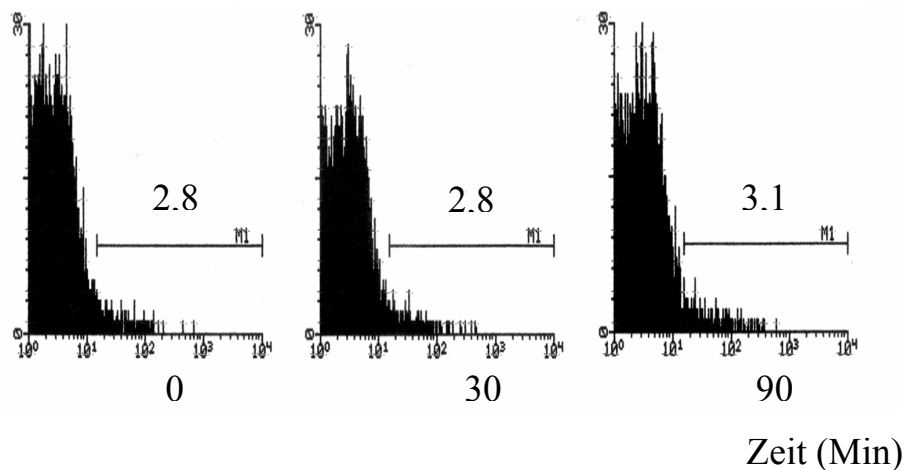


Abb 5: Die CD62P-Histogramme (P-Selektin) der FACS- Analysen eines Experimentes zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Zu jedem Zeitpunkt wurden fünftausend Thrombozyten gemessen. Unter der Makierung ist der Anteil der Zellen dargestellt, der durch die Bindung des fluoreszierenden Antikörpers an das exprimierte P-Selektin angefärbt wurde. Hierbei handelt es sich um aktivierte Thrombozyten. Der Anteil an aktivierten Thrombozyten ist gering und ändert sich über den Versuchszeitraum nicht.

3.1.6. Komplement-Aktivierung:

Die Serumspiegel der Komplementfaktoren C3c und C4 zeigten während des gesamten Versuchszeitraumes keine signifikanten Unterschiede und blieben zu jedem Zeitpunkt im physiologischen Messbereich. Es kam also durch den Kontakt der Blutzellen mit der Oberfläche des Perfusionssystems zu keiner Aktivierung des Komplementsystems.

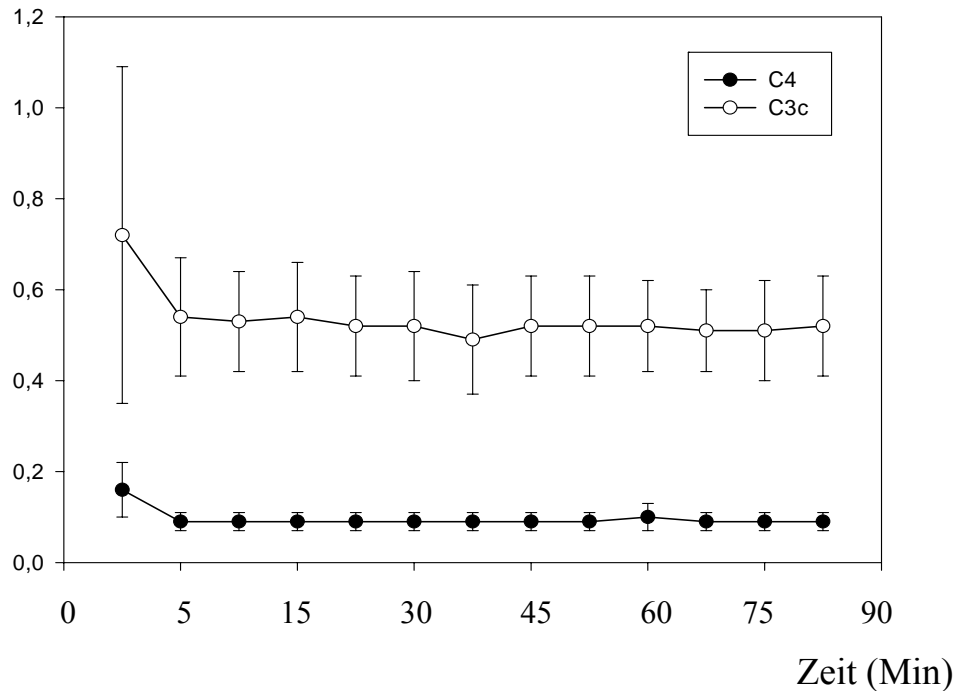


Abb. 6: Die Serumspiegel der Komplementfaktoren C3c und C4.
 Es treten keine signifikanten Unterschiede der Serumspiegel
 beider Komplementfaktoren auf.

3.2 Makrohämodynamik

Der Druck der Vena portae wurde als Parameter der Makrohämodynamik der Leber bestimmt. In der isogenen Gruppe lag der Druck innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes durchschnittlich bei ca. 12,4 ($\pm 1,2$) mmHg, was dem physiologischen Druck bei der Ratte von 11 mmHg entsprach [21]. In der xenogenen Gruppe D kam es zu einem durchschnittlichen Druck von 14,2 (± 4) mmHg. In der isogenen GPI 562 behandelten Gruppe B trat kein Unterschied im Vergleich zur isogenen Kontrollgruppe 12,3 ($\pm 0,5$) auf. In der xenogenen Gruppe E kam es dagegen zu einem Druckanstieg auf durchschnittlich 23,2 ($\pm 3,4$) mmHg. In der Hirudin behandelten Gruppe lag der Druck isogen mit 22,1 ($\pm 1,8$), deutlich über dem der isogenen Kontrollgruppe. Auch in der xenogenen

Gruppe kam es zu einer wesentlichen Erhöhung des portalen Druckes auf einen durchschnittlichen Wert von 33,1 ($\pm 3,3$).

	Druck (mmHg)
A. isogen	12,4 \pm 1,2
B. isogen+ GPI	12,3 \pm 0,5
C. isogen+ HIR	22,1 \pm 1,8
D. xenogen	14,2 \pm 4
E. xenogen+GPI	23,2 \pm 3,4
F. xenogen+HIR	33,1 \pm 3,3

Tab 4: Durchschnittlicher Druck in der Vena Portae in mmHG innerhalb des Versuchszeitraumes von 90 Minuten. Physiologischer Druck in den Gruppe A und B. Im Vergleich dazu erhöhter Druck in der isogenen Gruppe C. Ebenfalls erhöhter portaler Druck in den Gruppen E und F im Vergleich zur Kontrollgruppe D. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

3.3 Mikrozirkulation

3.3.1. Intravitalmikroskopische Beobachtungen bei der Reperfusion

In den isogenen Gruppen A, B und C waren die Sinusoide und die Azini fast vollständig und homogen durchblutet. Perfusionsausfälle sind auf den Videoaufnahmen der xenogenen Gruppen C, D und E durch den verlangsamten Fluss der Erythrozyten, bzw. durch eine Stase des Blutes deutlich zu erkennen. Im Standbild ist die Unterscheidung der perfundierten von den nicht-perfundierten Leberarealen wesentlich schwieriger. Auf den folgenden Abbildungen sind die nicht-perfundierten Sinusoide durch Agglutinationen von

Erythrozyten und eine Verbreiterung der Sinusoide zu erkennen. Die nicht-perfundierten Sinusoide erscheinen daher dunkler und breiter als das feine Netz der physiologisch perfundierten Sinusoide.

Abbildung 6 zeigt isogen perfundierte Azini ohne Perfusionsausfälle. In Abbildung 7 wurde dem ein xenogen perfundierter Azinus gegenübergestellt. Die nicht-perfundierten Sinusoide, die durch Agglutinationen im feinen Netzwerk der Azini auffallen, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Abbildung 9 wirkt durch die im Laufe der hyperakuten Abstossungsreaktion eintretende Schädigung der Endothel – und der Epithelzellen unklar und verschwommen. Hier entstanden inter- und intrazelluläre Ödeme, wodurch eine Fokussierung des intravitalmikroskopischen Bildes erschwert wurde und im Vergleich zur isogenen Gruppe zu unschärferen Aufnahmen führte.

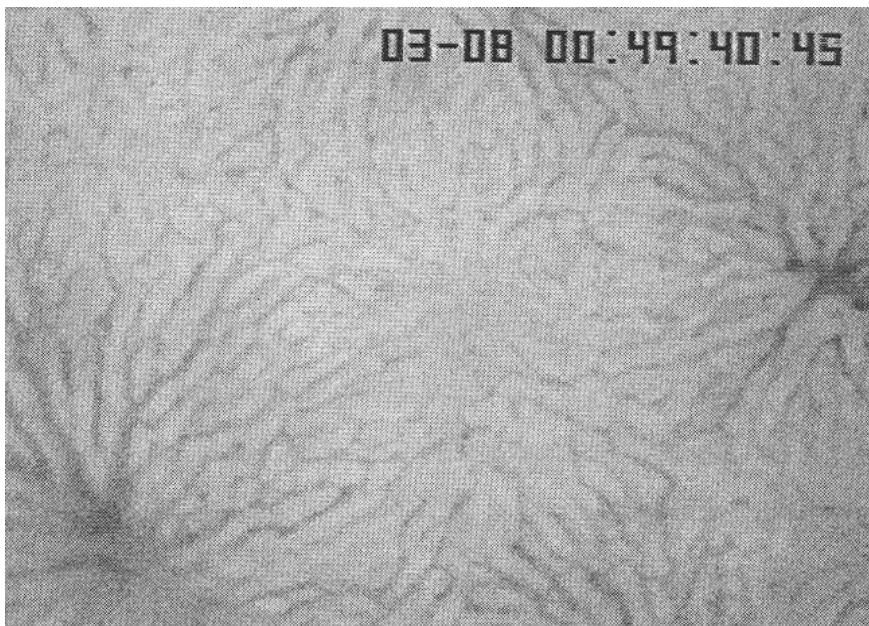


Abb 6: Azinus einer mit Rattenblut (isogen) perfundierten Rattenleber nach 50 Perfusionsminuten (Gruppe A). Es sind keine Perfusionsausfälle zu erkennen. Die Sinusoide erscheinen als feines Netzwerk.

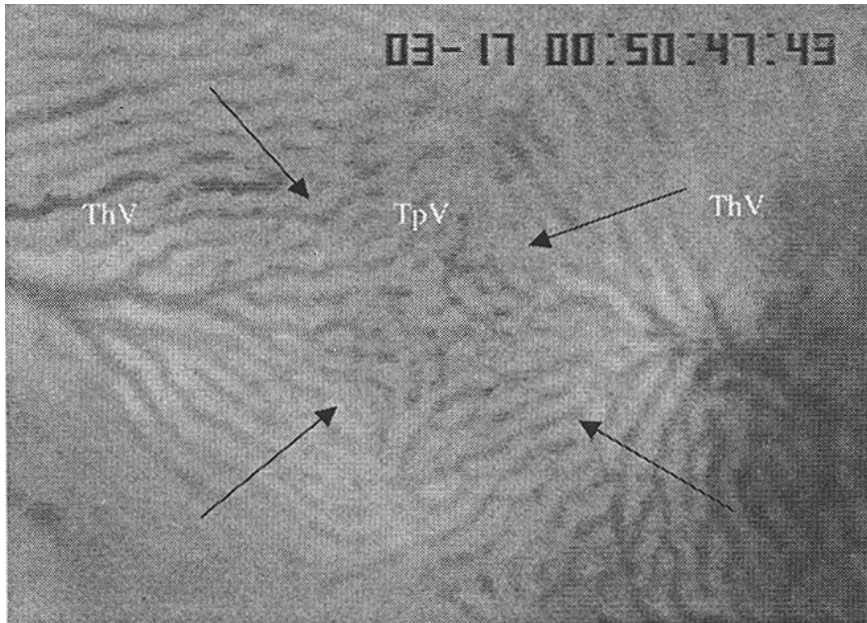


Abb 7: Ausschnitt aus einem Azinus einer mit Humanblut perfundierten Rattenleber nach 19 Perfusionsminuten (Gruppe D). Plumpe, verbreiterte Sinusoide (Pfeile) sind als Perfusionsausfälle zu werten.

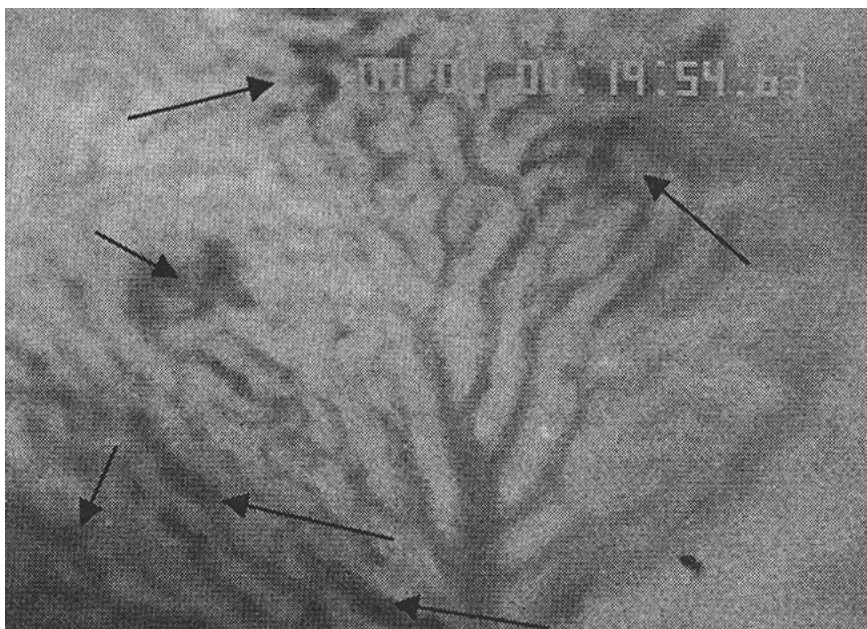


Abb. 8: Xenogen perfundierter Azinus aus der Gruppe D. Pfeile markieren die periportal gelegenen Perfusionsausfälle 50 Minuten nach Reperfusion.

In den isogenen Gruppen waren die Sinusoide in den drei Zonen (pp, mz, pz) annähernd gleich gut durchblutet. Dagegen traten in der xenogenen Gruppe D schwere Störungen der Mikrozirkulation auf. Diese Perfusionsausfälle konnten besonders der periportaln Zone zugeordnet werden. (Abb 8).

In Gruppe D wurde die Perfusion im Laufe der Zeit zunehmend schlechter. Intravitalmikroskopisch konnte besonders zu Ende der Perfusion eine Stase in den meisten Sinusoiden beobachtet werden. Viele Sinusoide waren nicht mehr durchblutet. Das Perfusat floss in grossen Gefässen an den durch Blutzellaggregate verstopften Sinusoiden vorbei. Abb.9 zeigt diese schweren Störungen der Mikrozirkulation.

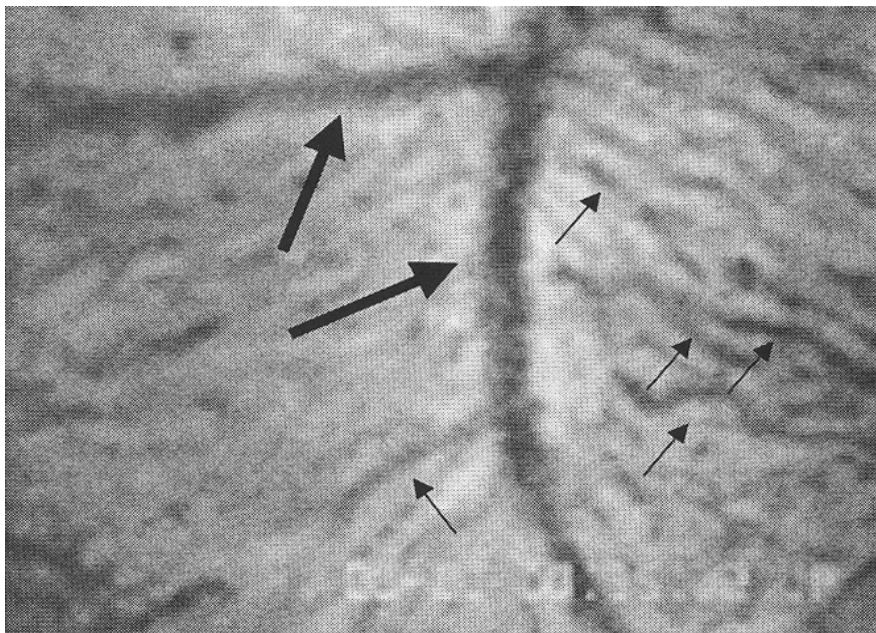


Abb 9: Xenogene Perfusion der Gruppe D nach 35 Minuten.

Nur noch grosse Gefässe (dicke Pfeile) sind perfundiert. In den kleinen Gefässen stockt der Blutfluss. Diese Stase ist durch dünne Pfeile in einigen Sinusoiden exemplarisch aufgezeigt.

3.3.2. Sinusoidale Perfusion

Die azinäre Perfusion wurde auch mittels der IVM analysiert. Hierzu wurden die Azini in die periportale (pp), midzonale (mz) und perizentrale (pz) Zone nach Rappaport [82] unterteilt. (Abb 5).

Die isogenen Gruppen A, B und C zeigten eine homogene und beinahe vollständige Perfusion. In Gruppe A waren gegen Ende des Versuchszeitraumes periportal 100 % (0,98), midzonal 100 % (1,0) und perizentral 100 % (0,99) der Sinusoide perfundiert.

Auch in Gruppe B lag eine gleichmässige Verteilung der Perfusion mit periportal 86 % (0,93), midzonal 94 % (0,96) und perizentral 96 % (0,98) vor. In Gruppe C betrug die Perfusion mit periportal 97 %, midzonal 96 % und perizentral 100 %. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei isogenen Gruppen vor.

Im Vergleich zu den anderen xenogenen Gruppen trat in der Gruppe F ein geringerer Perfusionsausfall, mit periportal 72 %, midzonal 78 % und perizentral 85 % auf. Gruppe D und E wiesen massive Perfusionsausfälle auf. Periportal lag in Gruppe D die Perfusion periportal bei 48 %, midzonal bei 56 % und perizentral bei 80 %, in Gruppe E periportal bei 39 %, midzonal bei 45 % und perizentral bei 57 %.

3.3.3. Sinusoidaler Perfusionsindex

3.3.3.a. Zeitbezogener Index der sinusoidalen Perfusion

In allen sechs Gruppen fand sich im zweiten Versuchszeitraum ein deutlich niedrigerer sinusoidaler Index, als in der ersten Versuchshälfte. Die xenogenen Gruppen wiesen eine deutlich stärkere Verminderung des sinusoidalen Indexes auf, als die isogenen Gruppen.

3.3.3.b. Gesamtindex der sinusoidalen Perfusion

Der Gesamtindex der sinusoidalen Perfusion ist in der isogenen Gruppe A mit 1 ± 0 am grössten, gefolgt von den isogenen Gruppen B ($0,96 \pm 0,02$) und C ($0,98 \pm 0,02$), die jeweils niedrigere Ausgangswerte aufweisen, als die Gruppe A. In den xenogenen Gruppen zeigt sich in der Gruppe F der höchste Index mit $0,88 \pm 0,03$. Der niedrigste sinusoidale Index fand sich in der Gruppe E mit $0,84 \pm 0,06$.

Zeit (Min)	0-45	45-90	Gesamt
A. isogen	1 ± 0	$0,99 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0$
B. isogen+ GPI	$0,97 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,02$
C. isogen+ HIR	$0,99 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,02$
D. xenogen	$0,93 \pm 0,05 \#$	$0,85 \pm 0,07 \#$	$0,89 \pm 0,06 \#$
E. xenogen+GPI	$0,90 \pm 0,06$	$0,79 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,06$
F. xenogen+HIR	$0,89 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,03$

Tab. 4: Zeitbezogener und Gesamt-Index der sinusoidalen Perfusion.

In allen sechs Gruppen zeigt sich im zweiten Versuchszeitraum ein deutlich niedrigerer sinusoidaler Index, als in der ersten Versuchshälfte.

In den isogenen Gruppen (A, B und C) kommt es über den Versuchszeitraum zu einer geringgradigen Verminderung des zeitbezogenen Indexes. In den xenogenen Gruppen (D, E und F) hingegen kommt es zu einer deutlichen Verminderung des sinusoidalen Indexes vor allem im zweiten Versuchszeitraum.

#: $p < 0,05$, A vs. D.

Abbildungen 7.1-7.3: SPI, periportal, midzonal und perizentral

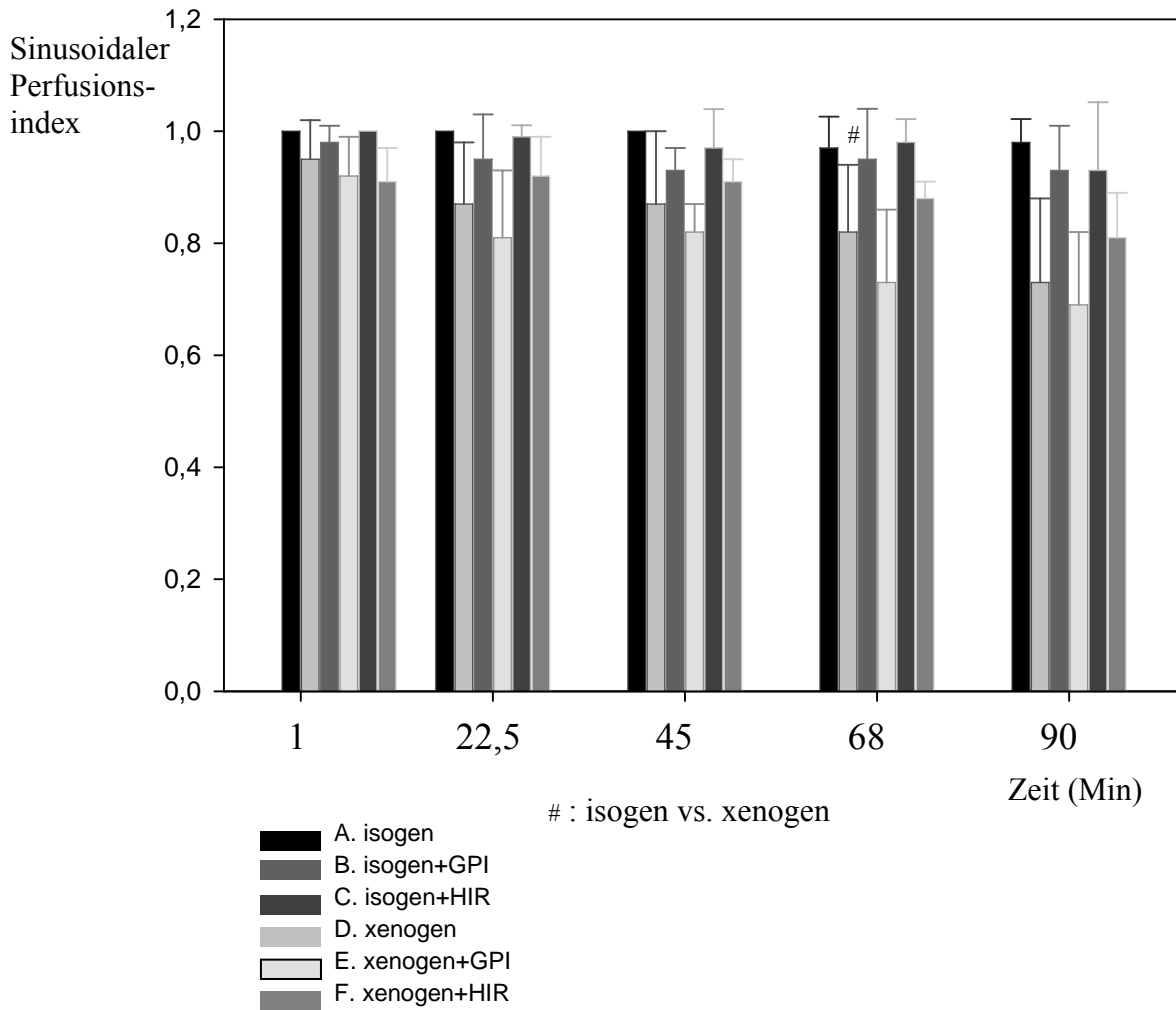


Abb. 7.1: Sinusoidale Perfusion, periportal: Physiologische und homogene Perfusion in A, B und C. Abnahme der sinusoidalen Perfusion in Gruppe D, E und F mit inhomogener Verteilung der Perfusionsausfälle (schlechteste Perfusion in Gruppe D), # : $p < 0,05$ periportal, A vs D

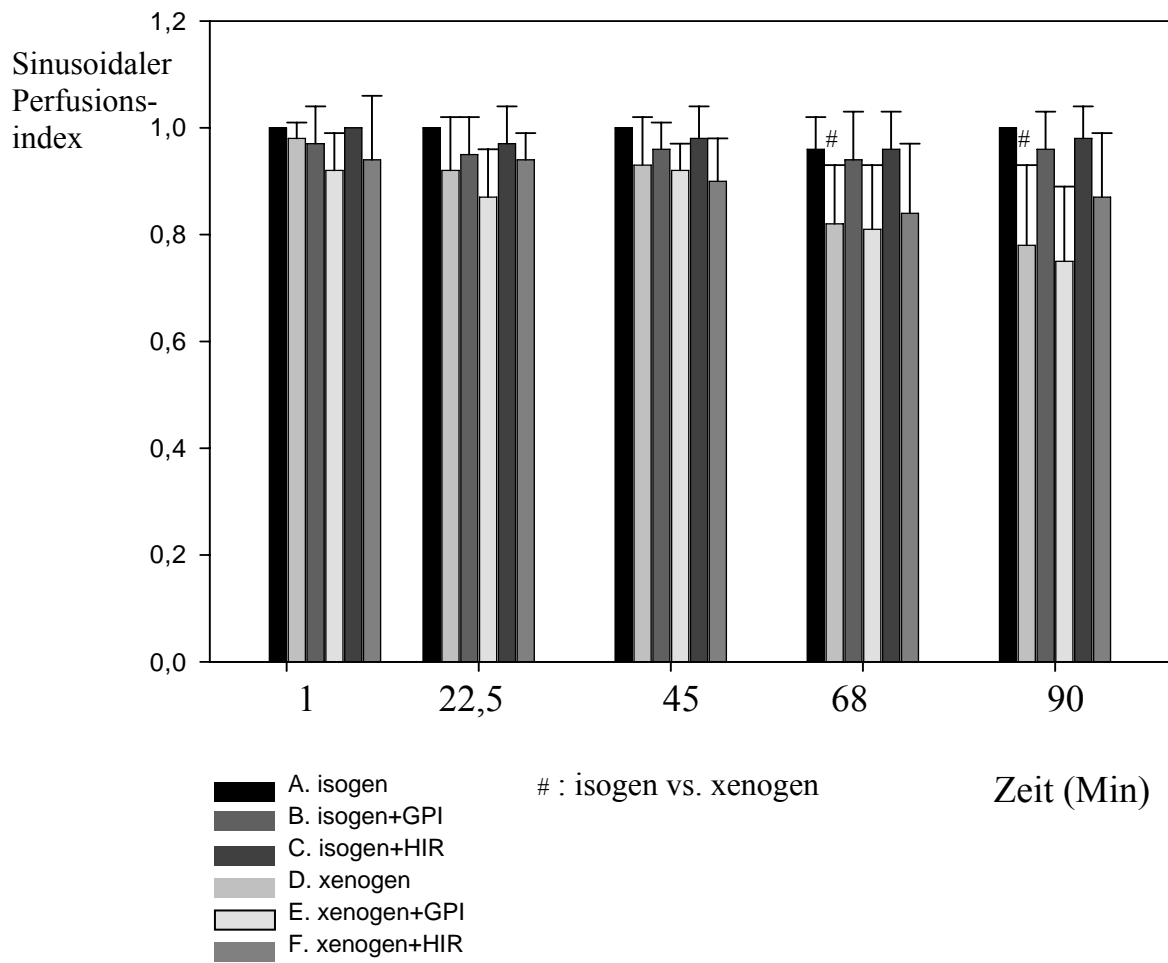


Abb. 7.2: Sinusoidaler Perfusionsindex, midzonal: (%). Signifikant verminderter SPI in der xenogenen im Vergleich zur isogenen Gruppe

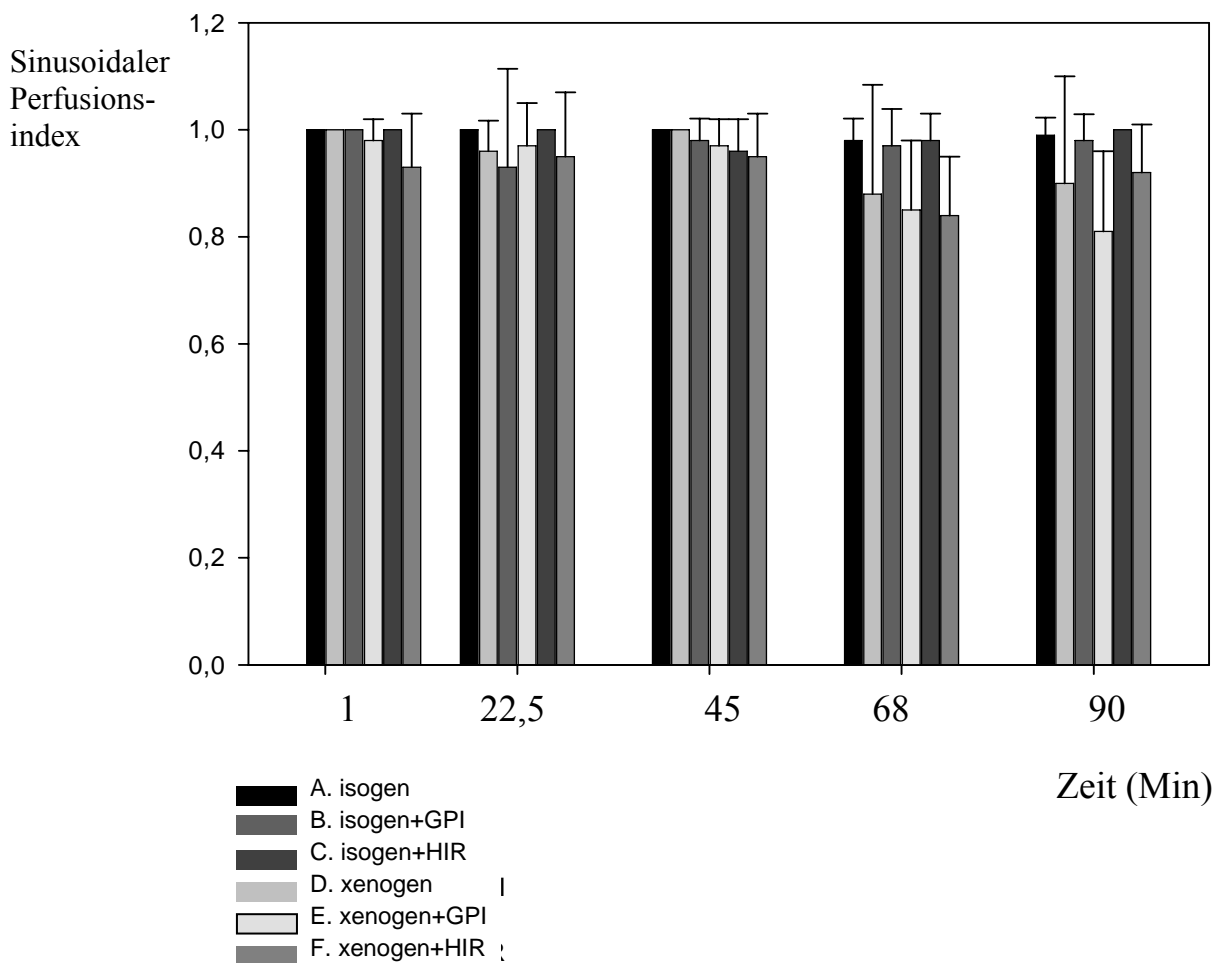


Abb. 7.3: Sinusoidaler Perfusionsindex, perizentral

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

3.3.4. Blutflussgeschwindigkeit

Der Index der sinusoidalen Perfusion wurde mittels Camas berechnet und gibt einen Überblick über die Geschwindigkeit des Blutflusses jeweils eines Azinus in mm/s wieder. Ein Wert von 1 steht für eine maximal gute Blutflussgeschwindigkeit in 1mm/Sekunde.

3.3.4.1. Blutflussgeschwindigkeit (Velocity)- postsinusoidal

Die Blutflussgeschwindigkeit in den postsinusoidalen Venolen kann die Leukozyten-Endothelinteraktion beeinflussen und wurde aus diesem Grund in allen Versuchen gemessen.

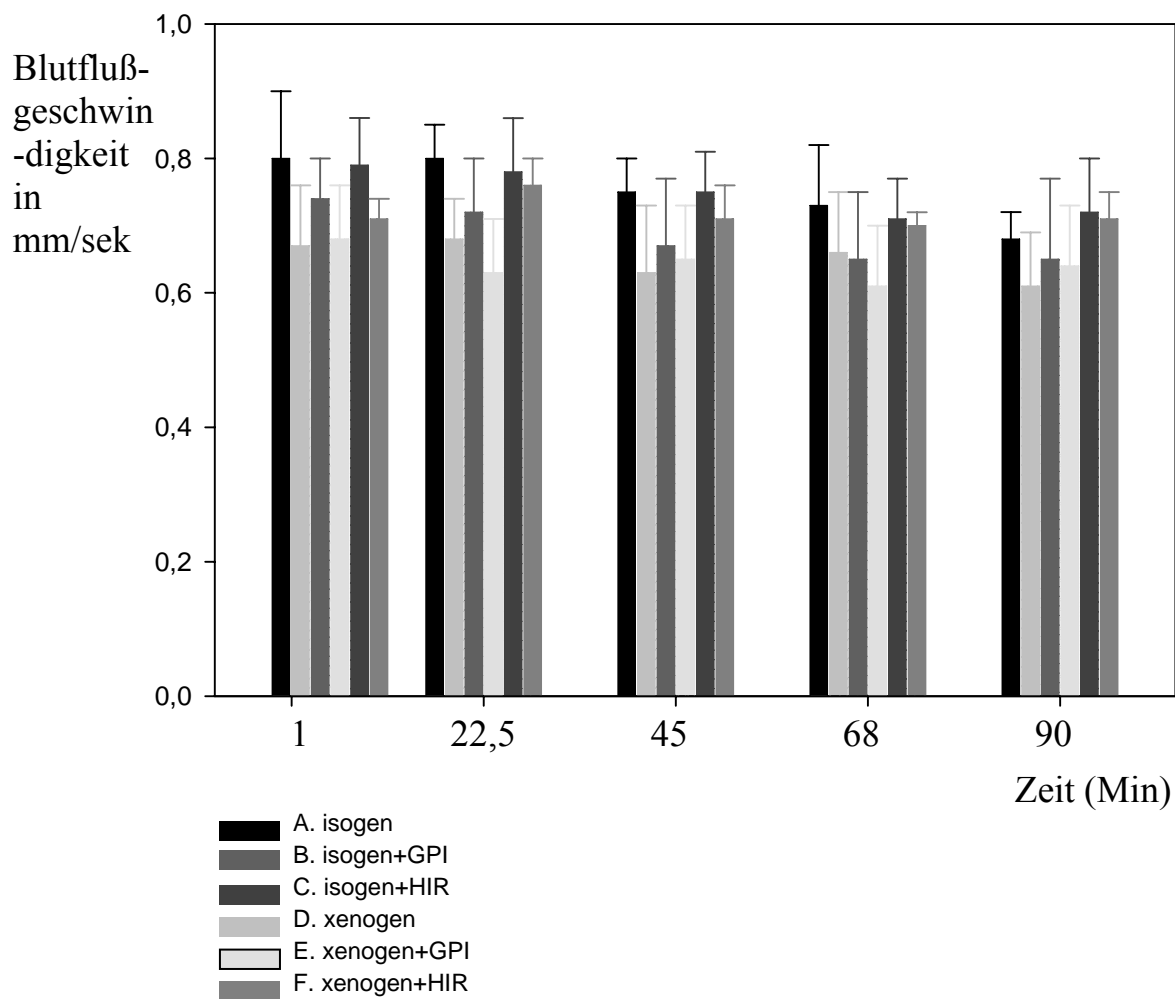


Abb 8: Blutflussgeschwindigkeit der postsinusoidalen Venolen

Die Blutflussgeschwindigkeit ist in allen sechs Gruppen innerhalb des Versuchszeitraumes von 90 Minuten gesunken. In der Gruppe F liegt die Blutflussgeschwindigkeit wesentlich höher, als in den anderen beiden xenogenen Vergleichsgruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen treten nicht auf.

3.3.5. Durchmesser der Sinusoide

Der sinusoidale Durchmesser in allen sechs Gruppen stieg über den Versuchszeitraum von 90 Minuten gering an. In der xenogenen Gruppe + Hirudin (Gruppe F) war der grösste Anstieg des sinusoidalen Durchmessers von 9 auf 12,5 μm zu verzeichnen.

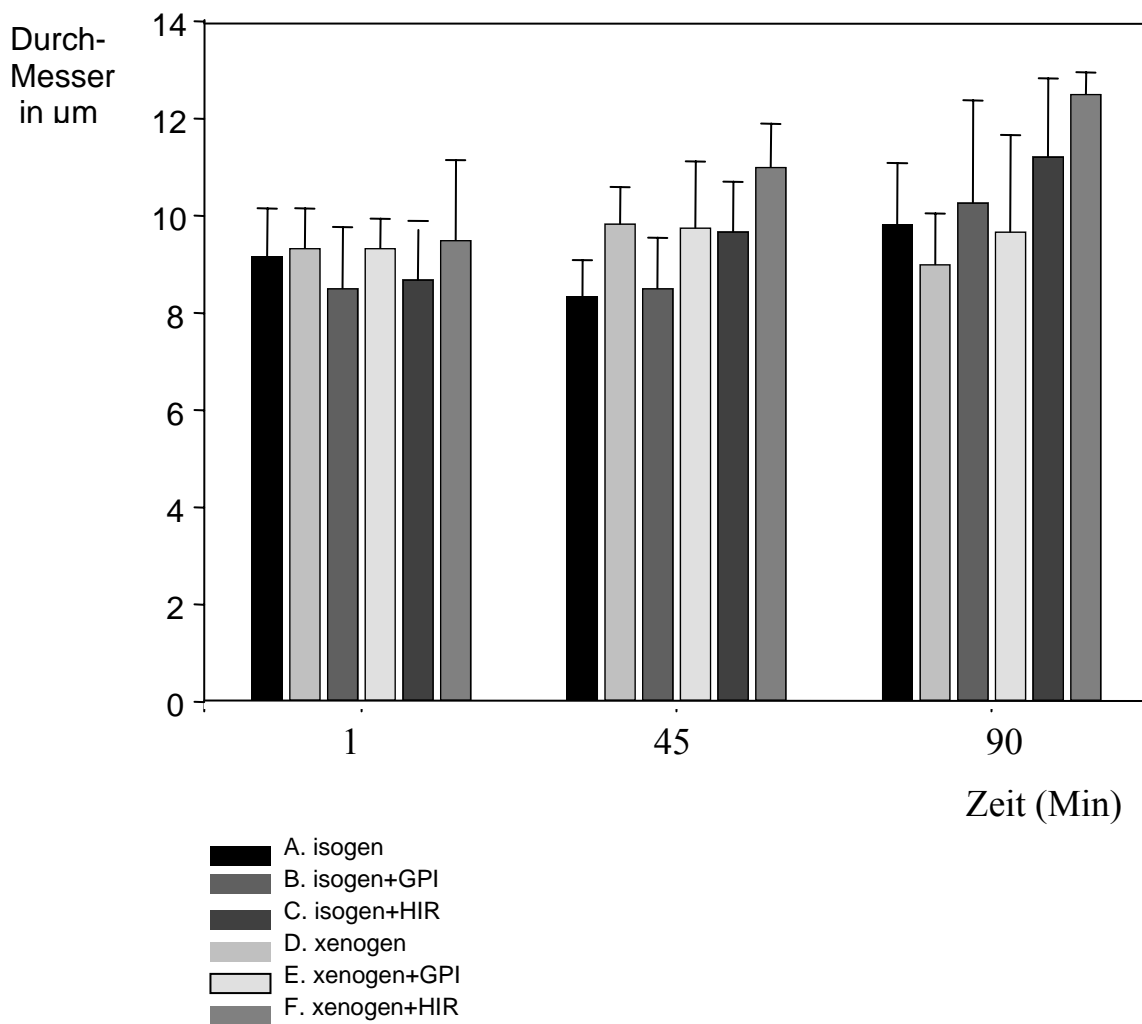


Abb. 9: Durchmesser der Sinusoide in allen sechs Gruppen über den Versuchszeitraum von 90 Minuten.

3.2.6. Intravitalmikroskopische Beobachtung der Leukozyten

Die im Perfusat enthaltenen Leukozyten wurden mit Rhodamin 6G angefärbt und konnten so als hell fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Abb. 10 gibt einen Teil der perizentralen Zone eines Azinus in starker Vergrößerung während isogener Perfusion wieder. Im Hintergrund ist das Netzwerk der Sinusoide dunkel zu sehen. Die Leukozyten sind als hell gefärbte Zellen zu erkennen, die sich mit dem Blutstrom bewegen oder als adhärente Leukozyten am Gefäßendothel stagnieren (mit dünnen Pfeilen markiert),.

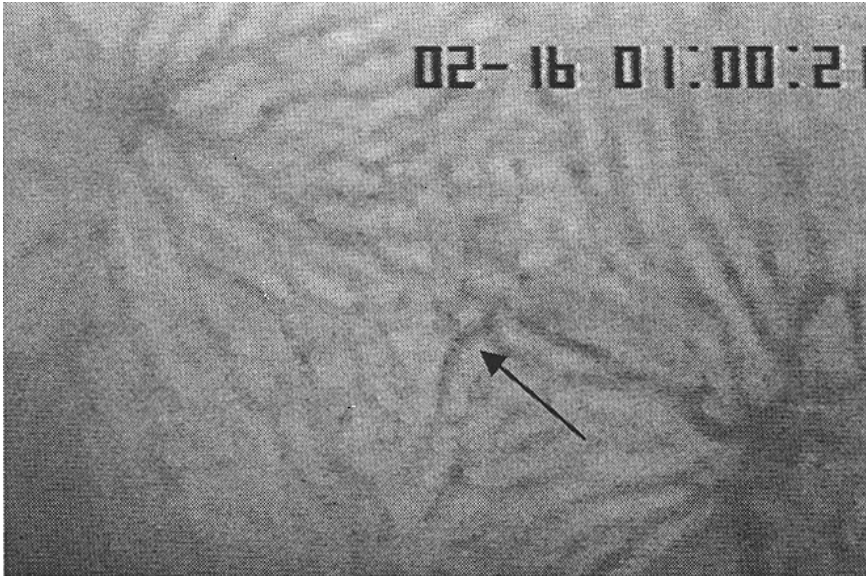


Abb. 10: Teil der perizentralen Zone eines isogen perfundierten Azinus. Leukozyten hell angefärbt. Dünne Pfeile: Sticker: stagnierende Leukozyten. 48 Minuten nach Reperfusion.

Sinusoidal adhärenente Leukozyten:

Im Gegensatz zu den isogenen Gruppen lagerten sich die Leukozyten in den xenogenen Gruppen schon zu Beginn der Reperfusion in grosser Zahl an das Endothel der Sinusoide an. Die Anzahl adhärenente Leukozyten ist als Leukozyten pro Minute wiedergegeben. In der xenogenen Gruppe + Hirudin (Gruppe F) ist die Anzahl adhärenente Leukozyten am geringsten, wohingegen es hier im weiteren Verlauf zu einem leichten Anstieg kam.

Die Zahl adhärenente Leukozyten war in den isogenen Gruppen niedrig und verminderte sich gegen Ende des Versuchszeitraumes deutlich.

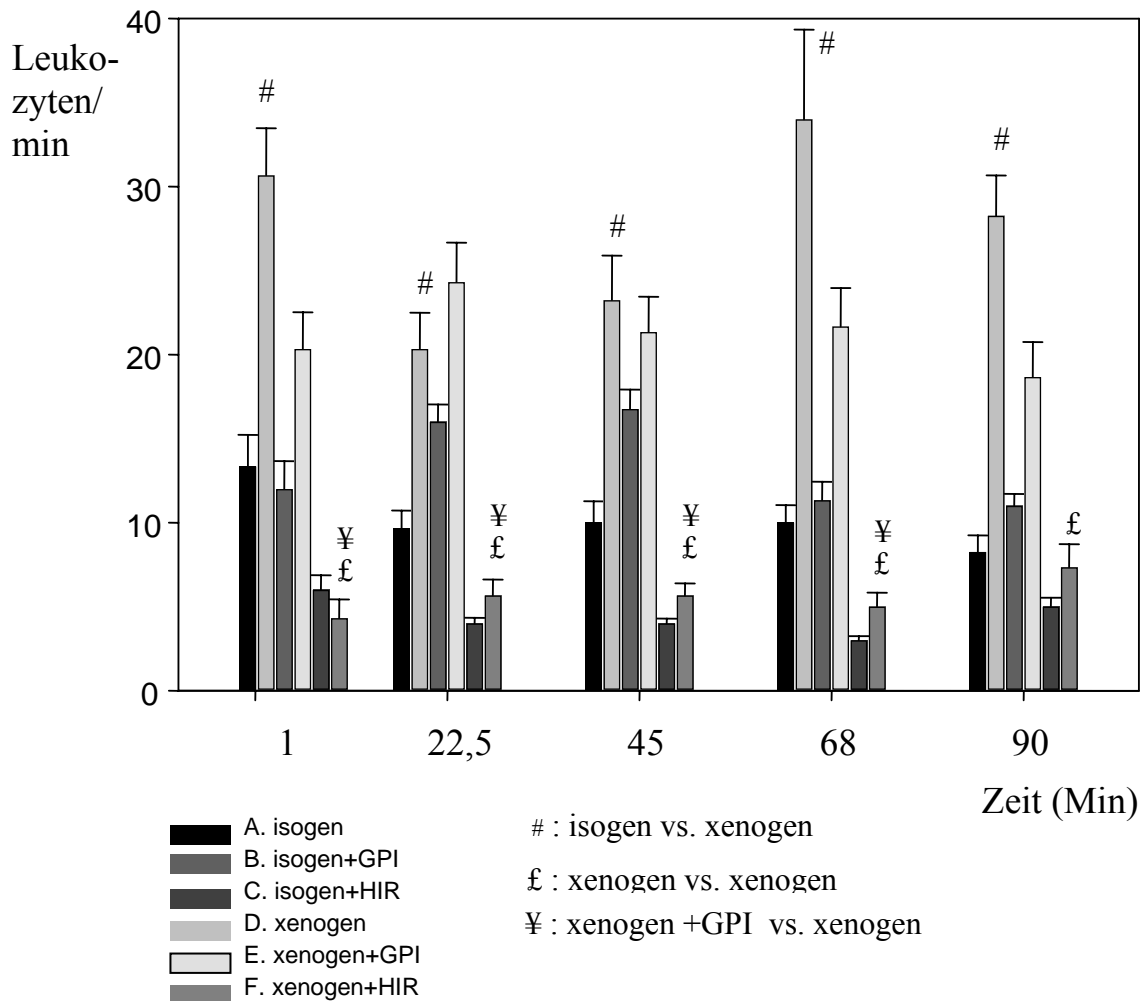


Abb. 10: Anzahl sinusoidal adh erenter Leukozyten

Sinusoidal rollende Leukozyten:

Auch bei der Anzahl an rollenden Leukozyten kommt es in den isogenen Gruppen zu einer geringfügiger Abnahme, als in den xenogenen Gruppen. In der isogenen Gruppe + Hirudin (Gruppe C) bleibt die Zahl während des gesamten Versuchszeitraumes auf annähernd demselben Niveau. In der isogenen Gruppe A und den xenogenen Gruppen D und F nimmt die Anzahl um etwa die Hälfte ab. In der xenogenen Gruppe E ist zu Beginn der Reperfusion eine hohe Anzahl an rollenden Leukozyten zu sehen, diese nimmt allerdings gegen Ende der 90 Minuten stark ab.

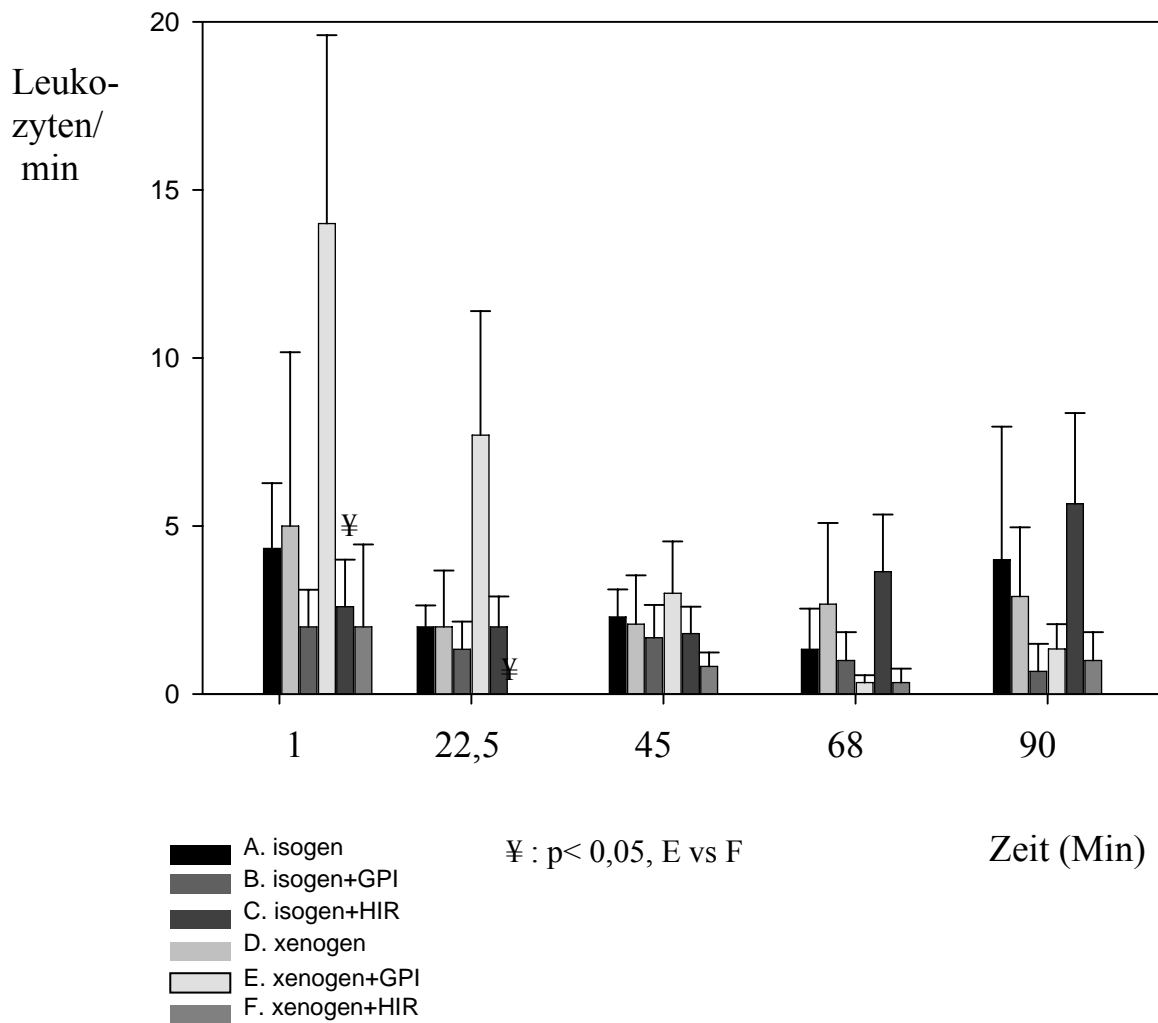


Abb. 11: Rollende Leukozyten, sinusoidal.

Sinusoidal freifliessende Leukozyten:

Die Flussrate der Leukozyten ist als Anzahl an Leukozyten definiert, die pro 30 Sekunden einen Lobulus frei passieren. Sie dürfen nicht länger als eine Sekunde am Endothel anlagern, da sie sonst den temporär stagnierenden Leukozyten zugeordnet werden.

In den isogenen Gruppen A, B und C kam es im Vergleich zu den xenogenen Gruppen zu einer geringgradigeren Abnahme der Anzahl fließender Leukozyten, wobei die Anzahl fließender Leukozyten in der Gruppe A im Vergleich gegen Ende des Versuchszeitraumes auf annähernd demselben Niveau bleibt.

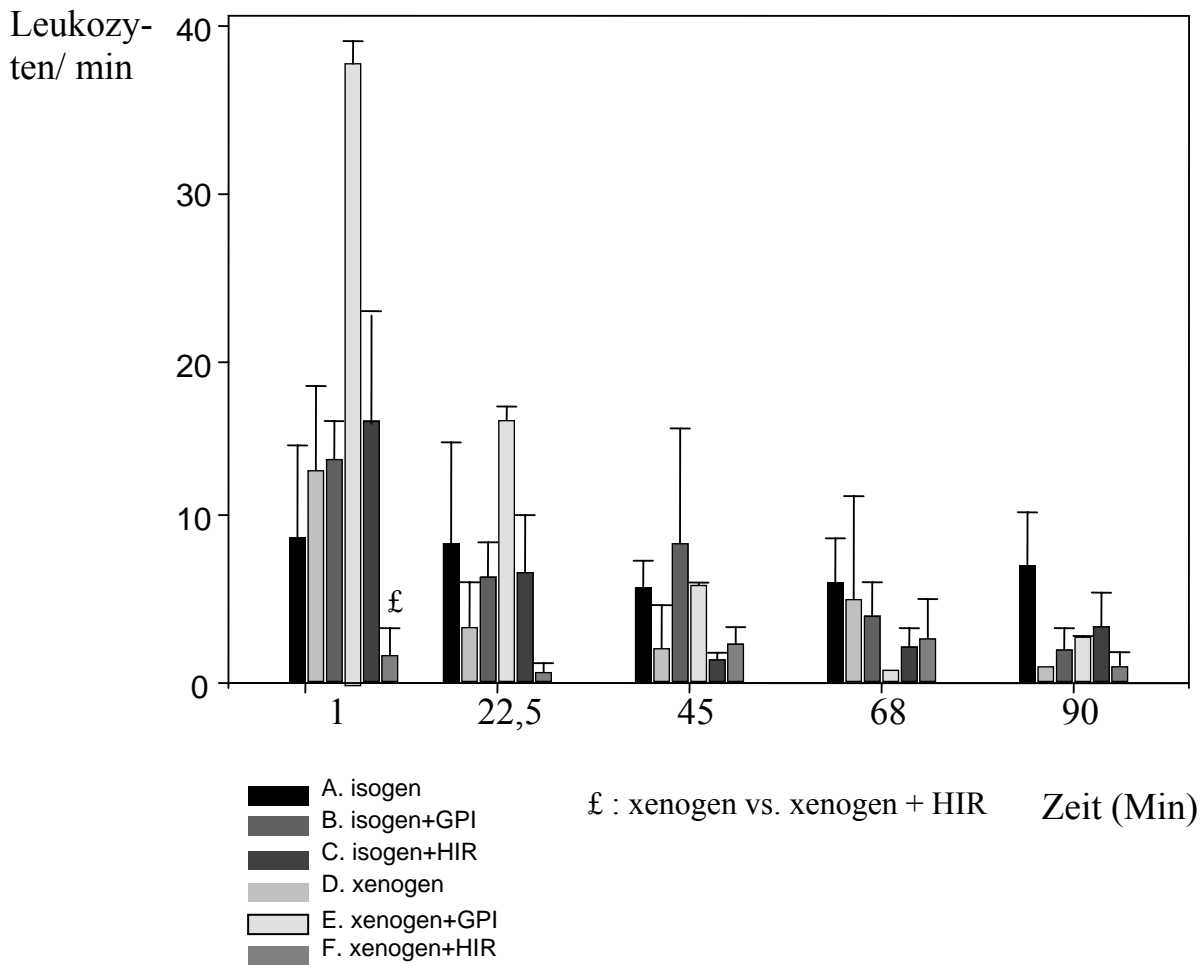


Abb. 12: Sinusoidal fließende Leukozyten

In den xenogenen Gruppen gibt es gegen Ende des Beobachtungszeitraumes kaum noch fließende Leukozyten, wobei in der Gruppe F bereits zu Beginn der Reperfusion der Ausgangswert sehr niedrig ist.

Postsinusoidal adh rente Leukozyten:

Auch in den postsinusoidal Venolen wurde die Anzahl der Leukozyten mit folgender Formel in Bezug zum Gefäss-Durchmesser und zur Segmentlänge gesetzt, wiedergegeben:

$$(N \text{ (Sticker) } / \text{ Gefäss-Durchmesser} \times \text{PI} \times \text{Segmentlänge}) \times 1\,000\,000$$

Durch diese Umrechnung kommt es zu grossen Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen. In den Abbildungen 8-10 sind IVM-Photos wiedergegeben. Die Auswertung der Adhäsion in den postsinusoidal Venolen ist der Abbildung 10 zu entnehmen.

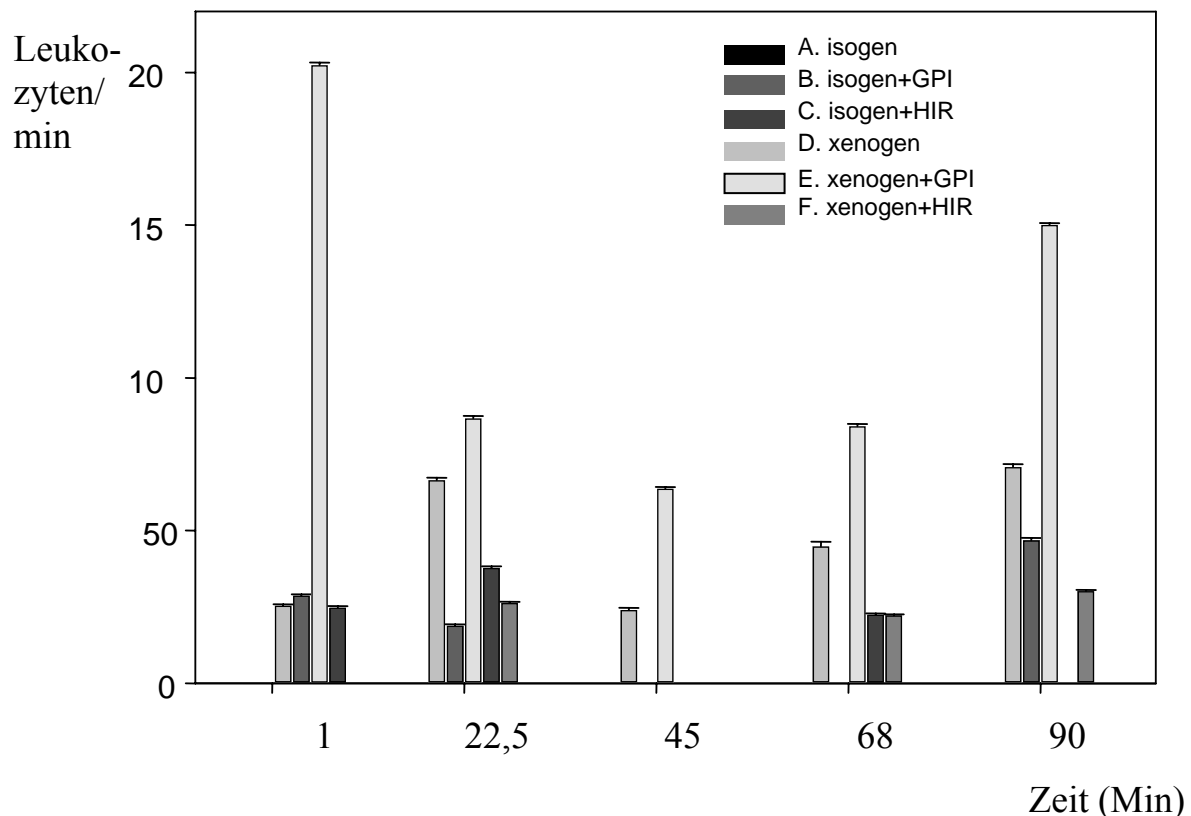


Abb. 13: Adhärente Leukozyten, postsinusoidal

Die Anzahl adhärenter Leukozyten ist in der Gruppe E am Grössten. Die xenogenen Gruppen D und F zeigen einen Anstieg gegen Ende des Versuches. In der Gruppe A sind von Beginn der Reperfusion an, in der Gruppe C gegen Ende der Reperfusion keine adhärenten Leukozyten zu verzeichnen.

Postsinusoidal rollende Leukozyten:

Die Anzahl rollender Leukozyten pro Minute ist in der Gruppe E am Höchsten, jedoch liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen vor (Abb. 14).

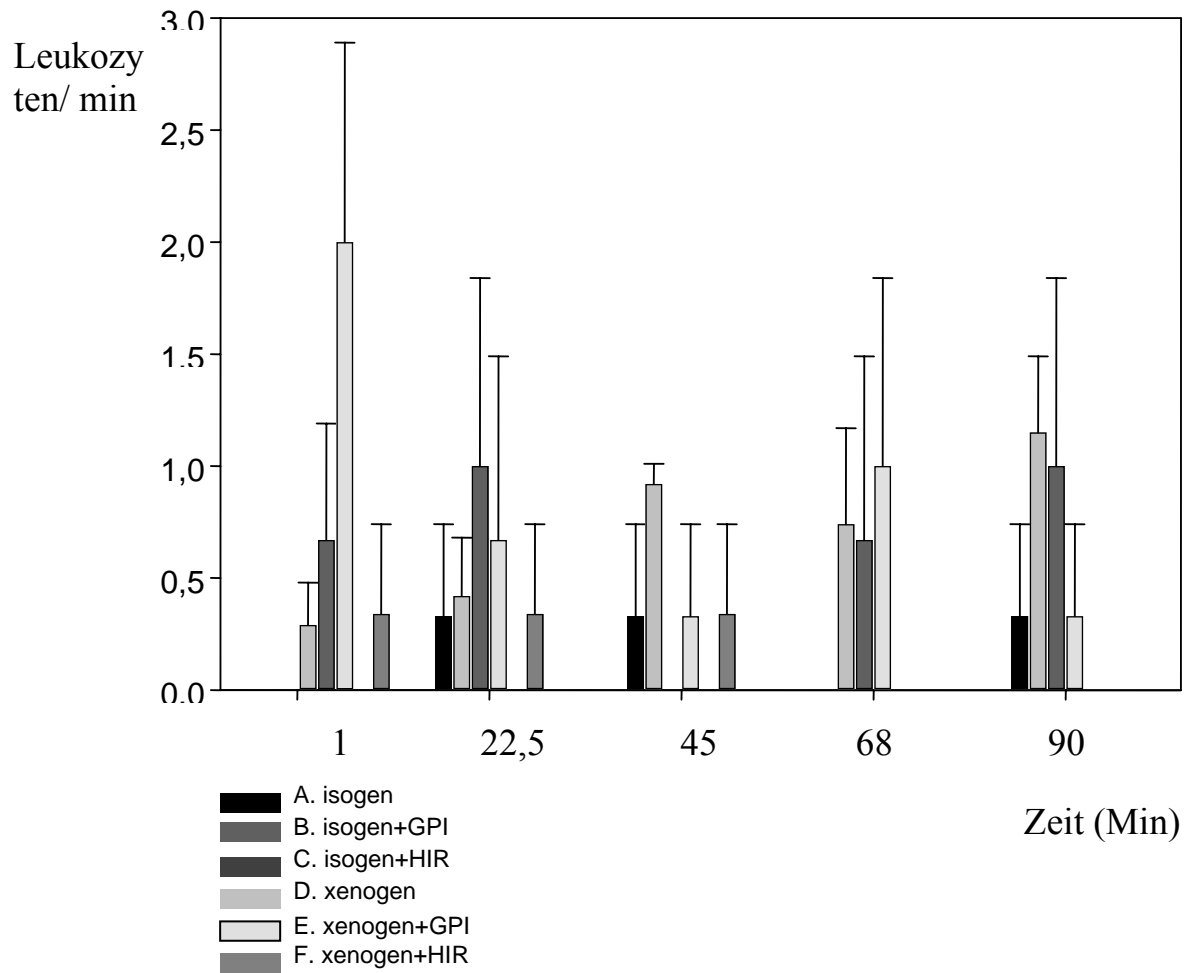


Abb. 14: Anzahl rollender Leukozyten, postsinusoidal

Postsinusoidal fließende Leukozyten:

Die fließenden Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen wurden erfasst und als Leukozyten pro Minute dargestellt (Abb 15). Die Anzahl fließender Leukozyten ist in den isogenen Gruppen am Höchsten, steigt sogar in der Gruppe A gegen Ende des Versuches über das Doppelte des Ausgangswertes an. In den drei xenogenen Gruppen ist bereits der Ausgangswert sehr niedrig. In den Gruppen D und E steigt die Anzahl fließender Leukozyten nur geringfügig an.

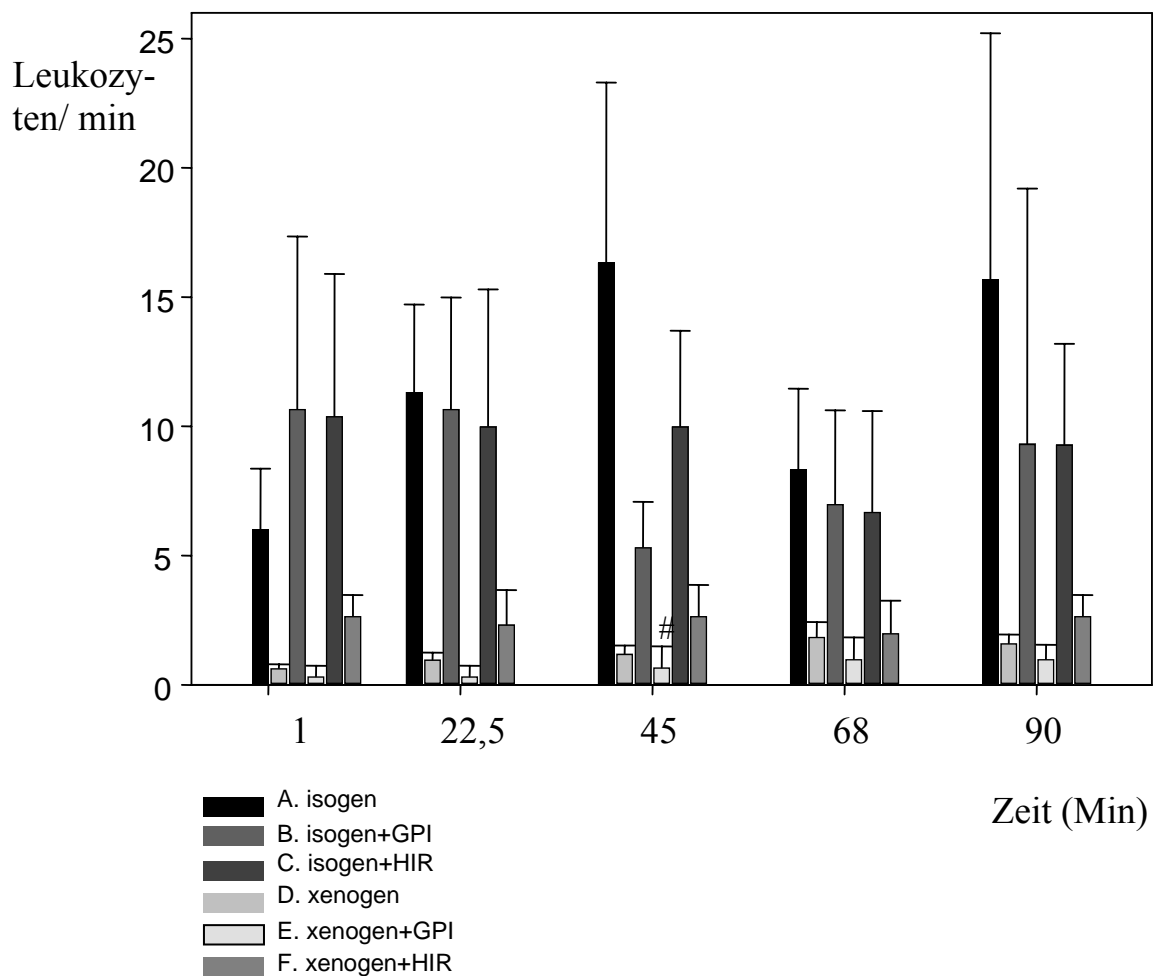


Abb 15: Fließende Leukozyten, postsinusoidal

3.4. Blutbild des Perfusats

3.4.1. Leukozyten im Perfusat

Die Anzahl der Leukozyten im Perfusat wurde mit Hilfe eines Coulter-Counters prä- und posthepatisch bestimmt. Die Tabelle 5 gibt die absoluten Werte der Leukozytenzählung nach der Passage der Leber in Tausend pro Mikroliter wieder.

Leukozyten

Zeit in Minuten	0	15	30	60	90
A isogen	7,3 (1,2)	2,5 (0,2)	2,5 (0,4)	2,3 (0,3)	2,3 (0,2)
B isogen+GPI	7,7 (0,7)	1,9 (0,4)	1,6 (0,5)	1,5 (0,5)	1,5 (0,4)
C isogen+HIR	7,2 (1,0)	1,9 (0,5)	1,87 (0,6)	1,9 (0,6)	1,8 (0,8)
D xenogen	7,4 (1,1)	0,6 (0,2)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)
E xenogen+GPI	6,4 (1,0)	1,3 (0,5)	0,8 (0,4)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)
F xenogen+HIR	6,2 (1,6)	1,1 (1,0)	0,9 (0,9)	0,8 (1,0)	0,7 (1,0)

Tab. 5: Anzahl der Leukozyten im Perfusat.

Mittelstarker, konstanter Rückgang in den Gruppen A, B und C.

Starke Reduktion der Leukozyten in den Gruppen D und E, im Vergleich weniger starke Reduktion in der Gruppe F. Zwischen den einzelnen Gruppen liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

3.4.2. Thrombozyten im Perfusat

Die Anzahl der Thrombozyten im Perfusat wurde ebenfalls mit Hilfe eines Coulter-Counters bestimmt. Die absoluten Werte der Thrombozyten-Zählung sind in Tabelle 6 in Tausend pro Mikroliter angegeben.

Thrombozyten

Zeit in Minuten	0	15	30	60	90
A isogen	863,3 (67)	439,3 (27)	447,5 (28)	417,3 (17)	422,3 (23)
B isogen+GPI	720,7 (51)	147,2 (18)	138,8 (29)	131,3 (21)	128,5 (15)
C isogen+HIR	830,7 (124)	370,7 (79)	374,7 (78)	361,5 (95)	382 (97)
D xenogen	263 (15)#	23 (19)#	8,5 (3,1)#	4 (3,9)#	2 (1,5)#
E xenogen+GPI	278,7 (39)	40,7 (23)	23,2 (8)	14,2 (1,9)	12 (1,3)
F xenogen+HIR	262,8 (27)	60 (56)	25,2 (20)	19,2 (25)	18,5 (27)

Tab. 6: Thrombozyten im Perfusat in 1000 pro Mikroliter.

In den Gruppen A und C kommt es zu einem Abfall der Thrombozyten zu etwa 50 %. Gruppe B wies im Vergleich eine signifikant stärkere Reduktion auf. In den xenogenen Gruppen kommt es zu einem massiven, signifikanten Abfall der Anzahl an Thrombozyten.

: $p < 0,05$ A vs. D

3.5. Laboruntersuchungen des Perfusats

3.5.1. Aspartat-Amino-Transferase (AST) im Serum (Tab. 7)

Die Konzentration der Aspartat-Amino-Transferase (AST) im Serum gilt als ein Maß für die Schädigung vom Leberparenchym. AST ist zu 70% mitochondrial gebunden, zu 30% zirkuliert es im Zytoplasma [18, 21]. Serum-AST ist ein Marker für schwere Leberschäden, bei welchen vor allem die Mitochondrien mitbetroffen sind. Der Basalwert der AST-Aktivität war im Humanblut und im Rattenblut unterschiedlich hoch. In den Gruppen A, B und C lag sie während des gesamten Versuches im Mittel zwischen 9,8 und 53,5 IU/L (Tab. 7). In den xenogenen Gruppen D, E und F lagen die Werte zwischen 9,7 und 84,3 IU/L. Als Norm gelten im Humanblut Werte unter 15 IU/L (Frauen) und 19 IU/L (Männer).

AST (GOT)

Zeit in Minuten	0	15	30	60	90
A isogen	13,0 (4)	14,2 (5)	15,8 (7)	21,3 (7)	22,3 (9)
B isogen + GPI	9,8 (2) *	20 (14) *	27,5 (13) *	40 (26) *	53,5 (25) *
C isogen + Hirudin	28,3(17) ¶	31,3 (19) ¶	34,2 (19) ¶	43 (30) ¶	47,2(31) ¶§
D xenogen	11 (11)	22,8 (13) #	27,7 (9)	37,8 (7)	84,3 (9) #
E xenogen + GPI	11,8 (4)	22,3 (19) §	23,2 (11)	22,3 (6) §	32,3(11) §
F xenogen+ Hirudin	9,7 (5)	21,3 (19)	29,2 (25)	41,8 (32)	53,5(38)

Tab. 7: AST-Aktivität im Perfusat in IU/L.

: $p < 0,05$ A vs. D; * : $p < 0,05$ A vs B; ¶ : $p < 0,05$ A vs C; § : $p < 0,05$ B vs C;

\$: $p < 0,05$ D vs E

In den Gruppen A und C war die Enzymaktivität nur geringgradig erhöht und ergab somit keinen Hinweis auf eine Leberzellschädigung unter isogenen Bedingungen. Die Freisetzung von Leberenzymen war in der Gruppe B signifikant höher, als in den beiden anderen isogenen Gruppen. Die Gruppe D wies mit 84,3 IU/l in der 90. Minute des Versuchszeitraumes die stärkste AST-Aktivität auf, was auf eine starke Leberzellschädigung hindeutet. Deutlich geringere Enzym-Aktivitäten wiesen die xenogenen Gruppen E und F auf, wobei der Wert in der Gruppe E wesentlich niedriger ist, als in der isogenen Gruppe B.

3.5.2. Alanin-Amino-Transferase (ALT) im Serum (Tab. 8)

Die Konzentration der Alaninaminotransferase (ALT) im Serum gilt ebenfalls als ein Maß für die Schädigung von Leberparenchym [18]. Die Konzentration der Alaninaminotransferase war im Humanblut und im Rattenblut etwa gleich hoch. Die Konzentration des Enzyms in der xenogenen Gruppe D nahm während des Versuchszeitraumes um das 3,5-fache, in der Gruppe F um das fünffache des Ausgangswertes zu. Im Vergleich dazu nahm die ALT-Aktivität

in der Gruppe E nur um das Doppelte des Ausgangswertes zu. Der Wert in der Gruppe A, B und C stieg bis zur 90. Minute nur geringfügig an.

ALT

Zeit in Minuten	0	15	30	60	90
A isogen	8 (4)	9,5 (4)	9,8 (4)	11,7 (5)	12 (5)
B isogen + GPI	22,5 (3) *	18,5 (4) *	22,2 (5) *	28,2 (7) *	32,8 (6) *
C isogen + Hirudin	12,5 (2) ¶§	13,2 (1) §	13,7 (2) §	16,1 (4) §	16,8 (2) §
D xenogen	8,33 (5)	14,8 (1) #	14,8 (3)	19,8(12)	28 (6) #
E xenogen + GPI	8,6 (4)	9,83 (3)	12,17(5)	16,6 (7)	19,67(6)
F xenogen+ Hirudin	7,7 (6)	18,5(18) \$	22,5 (23)	33 (29)	36 (30) \$

Tab 8: ALT-Aktivität im Perfusat in IU/L. Signifikant höhere Werte in Gruppe B, C, D und F:
 # : $p < 0,05$ A vs. D; * : $p < 0,05$ A vs B; ¶ : $p < 0,05$ A vs C; § : $p < 0,05$ B vs C; \$: $p < 0,05$ D vs E

3.5.3. Alkalische Phosphatase (APH) im Serum (Tab. 9)

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Leitenzym für Knochenerkrankungen mit erhöhter Osteoblastentätigkeit wird ferner zur differentialdiagnostischen Untersuchung von Leber- und Gallenwegserkrankungen herangezogen. Die APH ist bei 60% der hepatobiliären Erkrankungen erhöht. Bei allen intra- und extrahepatischen Cholestasen steigt die APH mässig bis stark an (bis ca. 1000 U/l). Der Normbereich der APH-Aktivität im Serum des Menschen liegt zwischen 50 und 170 IU/l [42].

APH

Zeit in Minuten	0	15	30	60	90
A isogen	56,3 (25)	54,7(22)	55,5 (19)	44,2 (20)	34,8 (24)
B isogen + GPI	133,8(25)	121 (15) *	118,3 (19) *	108 (13) *	89,2 (21) *
C isogen + Hirudin	166,5(64) ¶§	140 (46) ¶	142,2 (47) ¶	139 (44) ¶	138,8(24) ¶§
D xenogen	115 (53)	121 (63) #	125 (76)	109 (64)	311 (192) #
E xenogen + GPI	85,4(14) \$	33,3(21) \$	33 (22) \$	33,5(17) \$	19,3 (22) \$
F xenogen+ Hirudin	32,2 (7)	29,3 (6) £	30,3 (6)	28 (6) £	28,5 (6) £

Tab 9: APH-Aktivität im Perfusat in IU/L. Signifikant höhere Werte in Gruppe B, C, E und F; #: $p < 0,05$, A vs. D; *: $p < 0,05$, A vs B; ¶: $p < 0,05$, A vs C; §: $p < 0,05$, B vs C; \$: $p < 0,05$, D vs E, £: $p < 0,05$, D vs. F

Die APH-Aktivität zeigt in allen Gruppen unterschiedlich hohe Ausgangswerte. Der obere Referenzwert von 170 IU wird allerdings nur von der Gruppe D mit 311 IU/L in der 90. Minute des Versuchszeitraumes überschritten. Dies kann ein Hinweis auf eine Cholestase sein. In den anderen Gruppen wird der Referenzbereich zu keinem Zeitpunkt überschritten, sondern nimmt bis zum Ende des Versuchszeitraumes ab. Demnach liegt kein weiterer Hinweis auf eine Cholestase vor.

3.5.4. Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum (Tab. 10)

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum ist ein unspezifischer Marker für die Schädigung von Gewebe und Zellen. Eine Erhöhung der LDH-Aktivität tritt zum Beispiel bei der ischämischen Schädigung des Myokards, bei der Hämolyse oder bei der Schädigung von Leberparenchym auf. Erst durch den Vergleich mit dem Hämolyseparameter freies Hämoglobin (Tab 11) ist es möglich zu unterscheiden, ob der LDH-Anstieg aus einer Hämolyse oder aus Parenchymschäden resultiert. Der Normbereich der LDH-Aktivität im Serum des Menschen liegt zwischen 120 und 240 IU/l [42].

LDH

Zeit in Minuten	0	15	30	60	90
A isogen	213 (78)	247 (110)	217 (44)	329 (77)	347 (91)
B isogen + GPI	151 (45)	274 (70)	428 (168)	400 (117)	618 (247) *
C isogen + Hirudin	231(131)	290 (112)	333 (135)	383 (126)	406 (153)
D xenogen	288(202)	340 (284)	462 (378) #	559 (347) #	495 (386) #
E xenogen + GPI	258 (90)	259 (61)	309 (44)	328 (71)	620 (276)
F xenogen+ Hirudin	214(176)	377 (353)	488 (458)	610 (583) §	589 (457)

Tab 10: LDH-Aktivität im Perfusat in IU/L. Signifikant höhere Werte in Gruppe B, D und F
: $p < 0,05$ A vs. D; * : $p < 0,05$ A vs B; ¶ : $p < 0,05$ A vs C; § : $p < 0,05$ B vs C; \$: $p < 0,05$ D vs E

Bei der Messung der LDH-Aktivität konnte zwischen den isogenen und den xenogenen Gruppen kein Unterschied nachgewiesen werden. Der Referenzbereich wurde gegen Ende des Beobachtungszeitraumes von allen sechs Gruppen überschritten und kann nun als Hinweis für eine Schädigung des Leberparenchyms gewertet werden. Die Gruppe B weist mit 618 IU/L in der 90. Minute die stärkste Erhöhung der Enzymaktivität auf. Auch in den Gruppen D und F liessen sich mit 559 IU/L und 610 IU/L in der 90. Minute hohe Serumspiegel von LDH nachweisen.

3.5.5. Freies Hämoglobin im Serum

Die Konzentration von freiem Hämoglobin ist ein direktes Maß für die Hämolyse, da das freie Hämoglobin nur aus zerstörten Erythrozyten stammen kann. Die Konzentration des freien Hämoglobins wurde in mg/dl dargestellt. Der Zeitpunkt 01 entspricht der Konzentration an freiem Hämoglobin im verdünnten Perfusat zum Zeitpunkt Null, vor Beginn der Reperfusion. In allen sechs Gruppen bleibt die Konzentration an freiem Hämoglobin über den gesamten Versuchszeitraum auf annähernd demselben Niveau (Gruppe C und D), bzw. nimmt geringfügig ab (Gruppe A, B, E und F). Demzufolge kann in

keiner der sechs Versuchsgruppen ein Anstieg des Hämolyseparameters „freies Hämoglobin“ verzeichnet werden (Abb. 11).

Hämoglobin

Zeit (Min)	01	15	30	60	90
A isogen	8,4 ± 0,6	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7	7,2 ± 0,8	7,3 ± 0,7
B iso +GPI	8 ± 1	7,2 ± 0,6	7,3 ± 0,7	7,2 ± 0,4	7,1 ± 0,6
C iso +HIR	8 ± 1	7,2 ± 0,5	7,2 ± 0,5	7,4 ± 0,6	7,5 ± 0,6
D xenogen	9,2 ± 0,2	9,1 ± 0,6 #	9 ± 0,4 #	9,4 ± 0,7 #	9,2 ± 0,8 #
E xeno+GPI	9,8 ± 0,7	7,9 ± 2,4 \$	7,5 ± 2,9 \$	6,6 ± 2,5 \$	6,4 ± 2,5 \$
F xeno+HIR	9,5 ± 0,3	8,6 ± 2,9	8,1 ± 2,7	8,1 ± 2,7	7 ± 3,3

Tab 11: Freies Hämoglobin in mg/dl. Zeitpunkt 01 entspricht dem Hämoglobinwert im verdünnten Perfusat. In allen sechs Gruppen blieb die Konzentration an freiem Hämoglobin über den gesamten Versuchszeitraum auf annähernd demselben Niveau. #: $p < 0,05$ A vs D; \$: $p < 0,05$ D vs E

3.6. Gallefluss

Der Gallefluss der Leber als Funktionsparameter, wurde durch eine Kanüle im Ductus choledochus aufgefangen, ermittelt und in μl pro Gramm Leber (Feuchtgewicht) und Minute berechnet (Abb.16)

Nach der Kanülierung des Ductus choledochus, wurde in allen Gruppen der basale Gallenfluss bestimmt. Dieser unterschied sich in den verschiedenen Gruppen um maximal $0,81 \mu\text{l/g} \times \text{Min}$. Nach Beginn der Reperfusion sank die Gallenproduktion in allen sechs Gruppen stark ab und blieb im weiteren Verlauf bis zum Ende des Versuches auf annähernd demselben Wert.

Die Gallenproduktion sank in der Gruppe C am stärksten von 2,53 (basaler Wert) auf $0,84 \mu\text{l/g} \times \text{Min}$. In der Gruppe B trat die höchste Gallenproduktion mit $3,13 \mu\text{l/g} \times \text{Min}$ (basaler Wert) auf, die sich gegen Versuchsende auf einen Wert von $1,59 \mu\text{l/g} \times \text{Min}$ einpendelte.

Der Basalwert in der Gruppe A wies keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe B auf. Ab der 30. Minute des Versuchszeitraumes, kam es in der Gruppe B zu einem signifikant stärkeren Gallefluss, als in der Gruppe A. In den anderen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

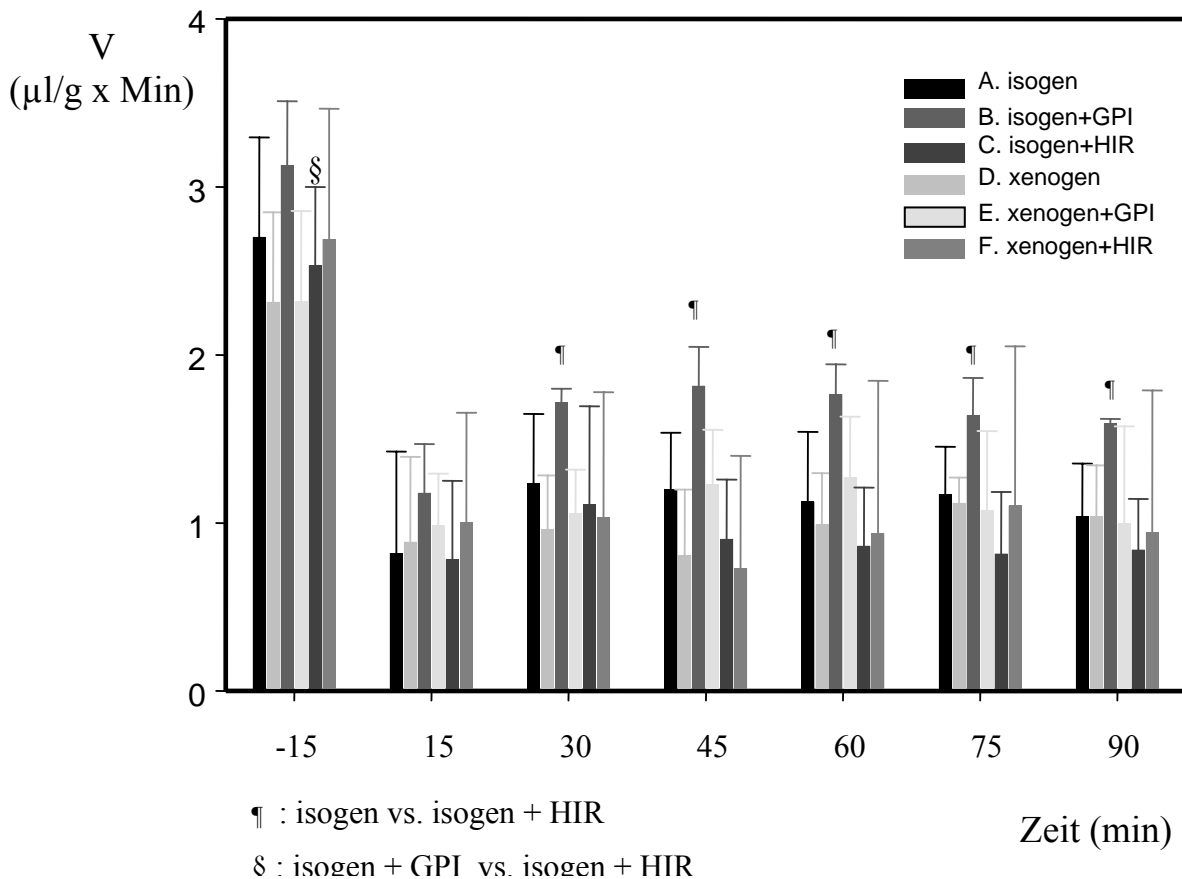


Abb 16: Galleproduktion in µl/g x min. Es bestehen signifikant grosse Unterschiede in der Galleproduktion zwischen der Gruppe A und B.

3.7. Histologie

Nach der Reperfusion wurden Gewebeproben (ca. 4 x 4 x 4 mm grosse Quader) der Leber zur histologischen Untersuchung entnommen. Die Proben wurden in 4% Paraformalin eingebettet und anschliessend 3-4 µM dicke Gewebsschnitte angefertigt. Die Färbung des Gewebes erfolgte routinemässig mit Hämatoxylin-Eosin, oder zur Färbung der Leukozyten mit Acetatesterase.

Auf den folgenden Seiten ist in der oberen linken Ecke ein Schnitt aus der Gruppe A, oben in der Mitte aus der Gruppe B, rechts oben aus der Gruppe C, links unten aus der Gruppe D, Mitte unten aus der Gruppe E und rechts unten aus der Gruppe F in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt.

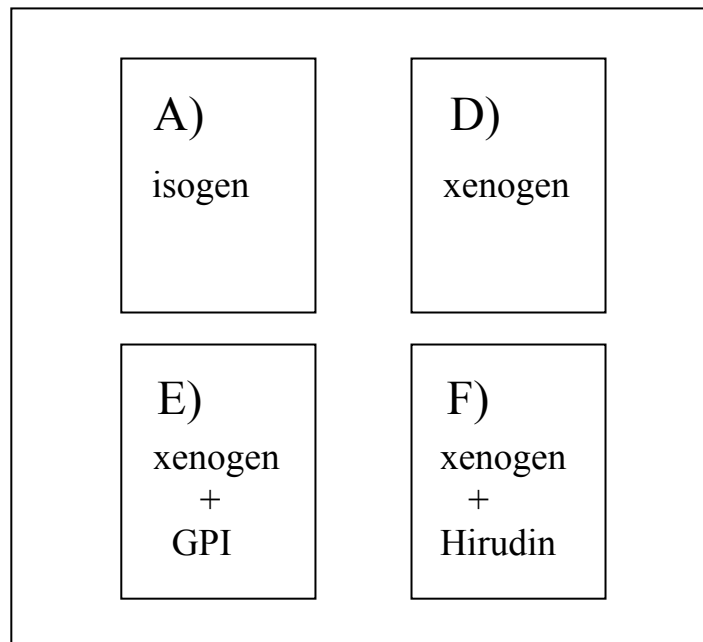


Abb. 11: Histologie-Schema

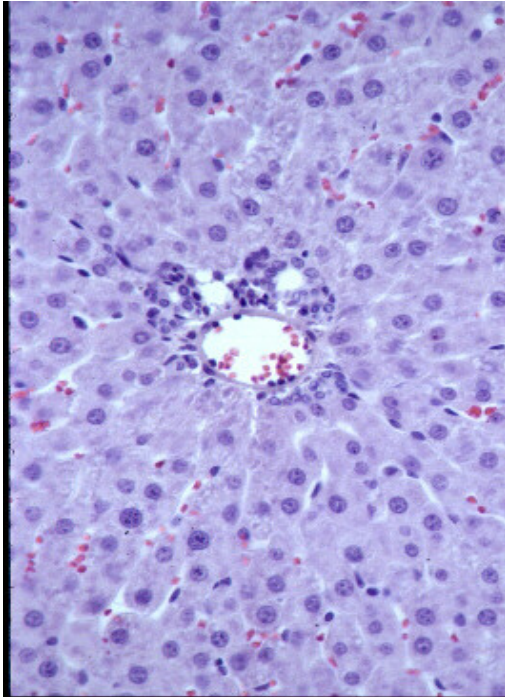
3.7.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Abb 12 a.)

Die histologische Untersuchung in der isogenen Perfusion ergab ein geringgradiges, interstitielles Ödem, als Zeichen einer Schädigung der Hepatozyten, wobei die Leberstruktur jedoch noch erhalten bleibt.

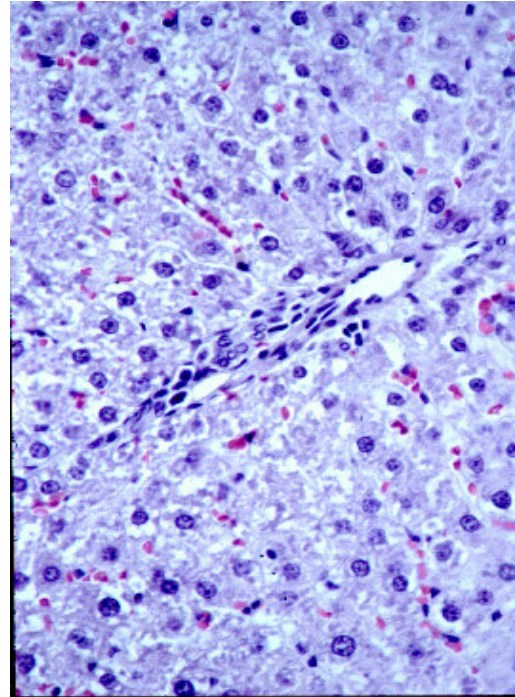
In Gruppe D trat im Vergleich zur Gruppe A eine deutliche Auflockerung des Gewebes und eine Auflösung der normalen Leberstruktur auf.

In der Gruppe F zeigt sich ein deutliches interstitielles Ödem, wobei die Gewebestruktur ebenfalls erhalten bleibt. In der Gruppe E ist das interstitielle Ödem weniger stark ausgeprägt, als in den beiden anderen xenogenen Gruppen.

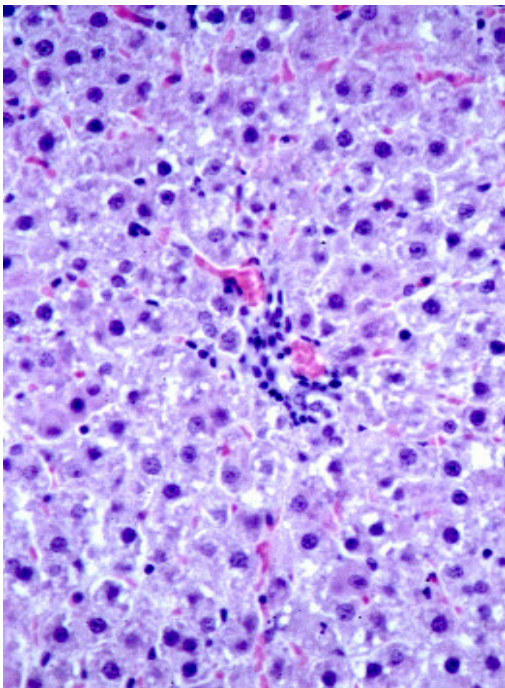
Hämatoxylin



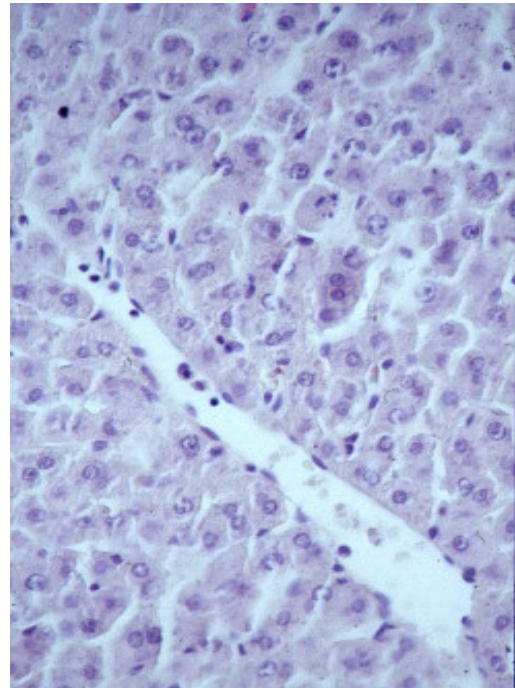
isogen



xenogen



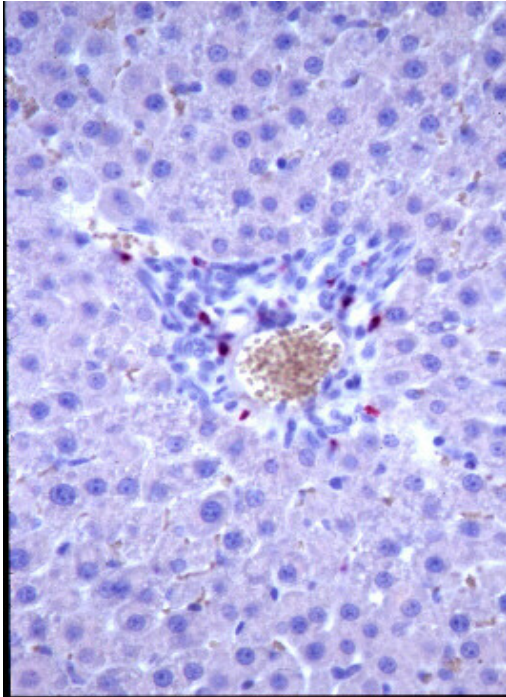
**xenogen +
GPI**



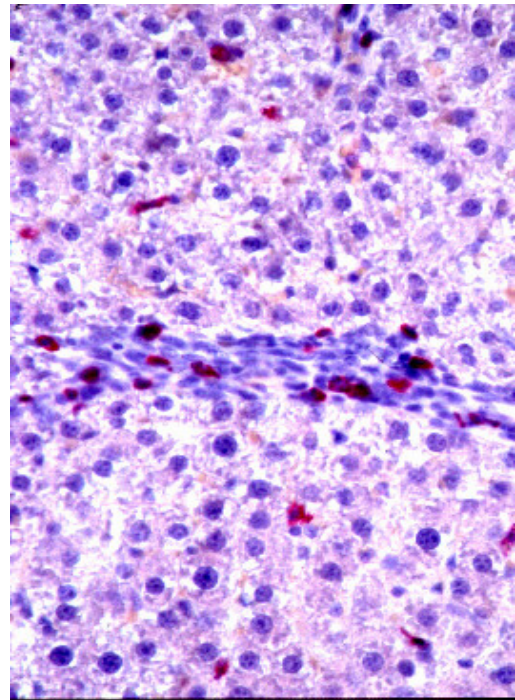
**xenogen +
Hirudin**

Abb 12 a.: Anordnung der Histologieaufnahmen in 400-facher Vergrößerung

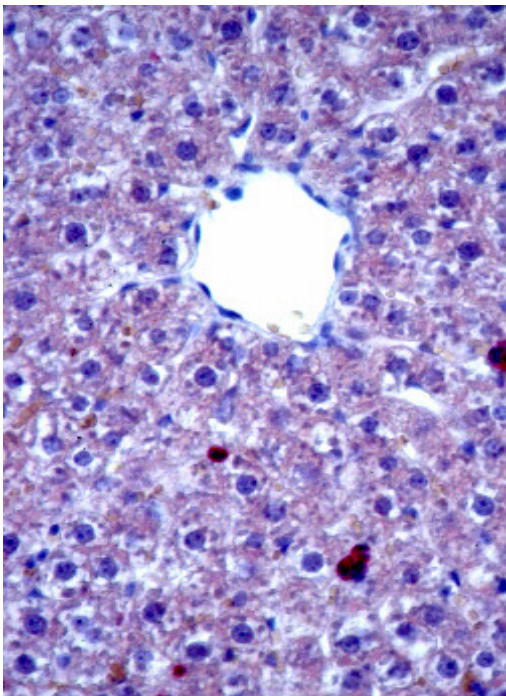
Acetat Esterase



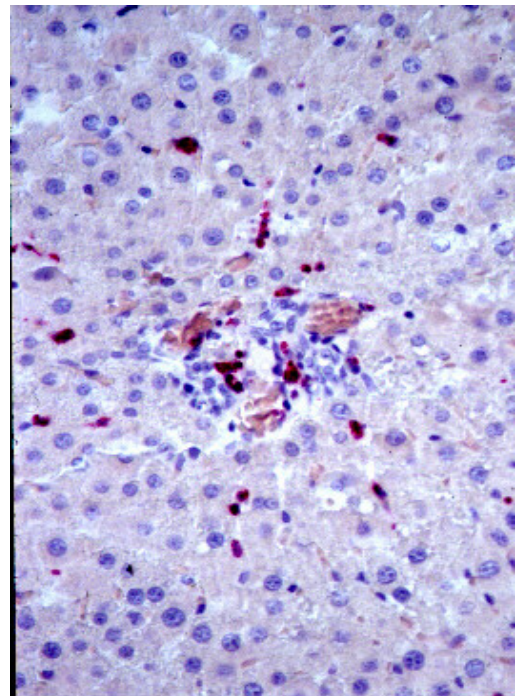
isogen



xenogen



**xenogen +
GPI**



**xenogen +
Hirudin**

Abb 12 b.: Anordnung der Histologieaufnahmen in 400-facher Vergrößerung

3.7.2. Acetat Esterase-Färbung (Abb12b.)

Zur Markierung der Leukozyten diente die Acetat-Esterase-Färbung. Durch die Rotfärbung konnte die Lokalisation und Verteilung des leukozytären Infiltrats in der Feinstruktur der Leber sichtbar gemacht werden.

In der Esterase-Färbung konnten in den Leberschnitten der isogen perfundierten Gruppe, vor allem perivasal Leukozyten nachgewiesen werden. Die Leukozyten in den drei xenogenen Gruppen lagen wiederum tief im Gewebe, wobei in der Gruppe D die höchste Dichte an Leukozyten zu sehen war.

4. Diskussion

4.1. Einleitung

Die hyperakute Abstossungsreaktion (HXR) bei der xenogenen Organtransplantation tritt vor allem in Form einer Störung der Makrohämodynamik und der Mikrozirkulation in Erscheinung (Tab 4, Abb. 7). Die Störung der Mikrozirkulation wurde bisher nur indirekt, d.h. durch histologische oder immunhistologische Untersuchungen [62, 65] erhoben. 1991 führten MD. Menger, I. Marzi und K. Messmer eine neue Methode zur direkten Analyse der Mikrozirkulation von Ratten- und Hamsterlebern ein: Die Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie (IVM) mit Auflichtbeleuchtung und Acridin Orange Fluoreszenzfärbung [65]. Diese Methode wurde 1992 durch die Einführung neuer Fluoreszenz-Farbstoffe (Natrium-Fluoreszein und Rhodamin 6 G) durch S. Post, MD. Menger, M. Rentsch et al. etabliert [80] und bei Untersuchungen des Ischämie/Perfusionsschadens [107] und des hämorrhagischen Schocks [105, 59] bei Kleintieren eingesetzt. Unsere Arbeitsgruppe kombinierte die xenogene Organperfusion mit der IVM: Erstmals konnte die Mikrozirkulation unter xenogenen Bedingungen untersucht werden.

4.2. Diskussion der Methodik

4.2.1. Perfusionsmodell Rattenleber/ Humanblut

Für den vorübergehenden extracorporalen Einsatz von xenogenen Organen als Assist-Device bieten sich Schweine als potentielle Organspender für den Menschen an [37]. Von Vorteil sind hier deren unkomplizierte und kurze Reproduktionszeit. Weiterhin stimmen die Grösse und die Anatomie des porcinen Organs „in etwa“ mit den der menschlichen Organe überein. Mit Hilfe der Gentechnik ist es neuerdings möglich, transgene Schweine zu züchten, die humane Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) auf der Oberfläche ihrer Zellen tragen [2, 24]. Die Untersuchung einer mit Humanblut perfundierten Schweineleber ist das ideale Modell für zukünftige

Xenotransplantationsmodelle: Allerdings ist die Schweineleber aufgrund ihrer dicken, fibrösen Kapsel, die die Sicht auf das Gewebe einschränkt, der IVM nicht zugänglich, wohingegen sich die Rattenleber sehr gut für die Analyse der Mikrozirkulation eignet, da sie keine fibröse Kapsel besitzt. 1981 wurde ein [64] Perfusionskreislauf etabliert, der sich nach einigen Modifikationen gut für die xenogene Perfusion eignete. Die Rattenleber ist also technisch gesehen optimal für unsere Fragestellung. Ist nun die Rattenleber auch in immunologischer Hinsicht mit der Schweineleber vergleichbar?

Die HXR wird durch die Bindung von präformierten natürlichen (pnAK) an das Endothel des xenogenen Organs ausgelöst [34]. Die pnAK sind in menschlichem Serum vorhanden [33] und hauptsächlich gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet: Das Gal (1-3) Gal-Epitop [86]. Dieses Epitop ist in vielen Säugetieren, so auch in Schweinen [57] und Ratten [97] auf den Endothelzellen zu finden. Die Organe von Schweinen und Ratten stimmen also in Bezug auf die Xeno-Antigenpräsentation überein.

Altweltaffen (Gibbons, Orang Utans, Gorillas, Schimpansen) und Menschen exprimieren Gal (1-3)Gal nicht, haben jedoch hohe Antikörpertiter gegen das Gal(1-3) Gal-Epitop im Blut [34, 37].

Für das System Schwein/Mensch, nachgestellt in einem Perfusionsmodell, können also verschiedene Säugetiere und Nager als Organspender und Menschen oder Altweltaffen als Blutspender verwendet werden.

Somit ist unser System Ratte/Mensch ein geeignetes Modell, welches aus immunologischer Sicht Vergleiche zum System Schwein/Mensch zulässt und gleichzeitig der IVM zugänglich ist.

4.2.2. Perfusionskreislauf

Die einzige Möglichkeit, die Wechselwirkungen zwischen dem menschlichen Immunsystem und Tierorganen zu beobachten, besteht durch den Einsatz eines Perfusionssystems. Systeme für die xenogene Hämoperfusion von Herzen [100], Nieren [89], und Lebern [78], sind als Assist Device bereits etabliert.

Unser Perfusionssystem zeigte in Bezug auf das technisch Vorgehen grosse Vorteile:

4.2.3. Perfusatpräparation

Durch die Zugabe des GPI 562 Peptid in das Perfusat, wurde in den Gruppen B und E, der GP IIb/IIIa Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten, inhibiert. GPI 562 verhindert die Bindung der Thrombozyten an lösliches Fibrinogen und damit die Aggregation der Thrombozyten. Ein weiterer Effekt ist die durch z.B VWF, Fibronektin oder Vitronektin vermittelte Adhäsion der Thrombozyten an matrixständiges Fibrinogen, die ebenfalls durch GPI 562 inhibiert wird. GP IIb/IIIa hat also sowohl eine Funktion bei der Adhäsion, als auch bei der Aggregation der Thrombozyten [19,31].

In den Gruppen C und E wurde durch die Zugabe von Hirudin Thrombin inhibiert. Hirudin bildet mit Thrombin einen 1:1 Komplex mit niedriger Dissoziationskonstante ($K < 1 \text{ pm}$) und hemmt so die proteolytischen Eigenschaften des Thrombins, so z.B die Thrombozyten-Aktivierung, die Bildung von Fibringerinnseln, und die Leukozyten-Adhäsion [40, 47].

4.2.4. Intravitalmikroskopie

Die IVM ist eine neue Methode, die es ermöglicht, die Mikrozirkulation der Leber in vivo sichtbar zu machen. [65].

Diese Technik eignet sich gut zur Untersuchung der HXR, da sich dort die pathologischen Veränderungen zuerst in der Mikrozirkulation manifestieren [22, 77, 101]. Durch die Markierung des Plasmas mit Natriumfluorescein und der Leukozyten mit Rhodamin 6G kann die Dynamik von Veränderungen der Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothel-Interaktion verfolgt werden [97]. Es können zwei Abschnitte der Leber mittels Mikrozirkulation dargestellt werden:

Die Sinusoide und die postsinusoidalen Venolen. In diesen Bereichen können Parameter, wie azinäre und sinusoidale Perfusion, Durchmesser der Sinusoide, rollende und adhäsive Leukozyten, sowie die Fließgeschwindigkeit von Leukozyten bestimmt werden. Diese Vielzahl an Messungen erlaubt eine genaue Darstellung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen, von Perfusionsausfällen und Störungen der Mikrozirkulation. Ein Nachteil, den die IVM mit sich bringt, ist, dass durch die Aufsichtbeleuchtung nur die Mikrozirkulation der Leberoberfläche, nicht jedoch die tieferen Abschnitte analysiert werden können. Die Transillumination der Leber würde zwar eine Analyse tieferer Leberschichten zulassen, die Möglichkeit der Leukozytenbeobachtung würde jedoch entfallen [64, 65]. Daher wurde die Aufsicht-Fluoreszenz-Mikroskopie bevorzugt.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Makrohämodynamik

Zur Evaluierung des Blutflusses in den grossen Lebergefässen wurde der Perfusionsdruck in der Vena portae bestimmt. In den isogenen Gruppen A und B lag der Perfusionsdruck im physiologischen Bereich [36], was für eine adäquate Funktion des Perfusionssystems spricht. In der hirudinbehandelten isogen perfundierten Gruppe C kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg des Perfusionsdruckes. In den xenogen perfundierten Gruppen kam es, wie erwartet, zu einem Anstieg des Perfusionsdruckes. Allerdings war der Perfusionsdruck in der xenogenen Gruppe D im Vergleich zu der isogenen Gruppe A nur geringfügig erhöht, wohingegen es in den xenogenen Gruppen E und F im Vergleich zur Gruppe D zu einem signifikanten Druckanstieg kam. Dieser Druckanstieg kann als Folge der ausgeprägten Mikrozirkulationsstörung der xenogen perfundierten Gruppen gedeutet werden. Warum der Druckanstieg in den mit GPI 562 und mit Hirudin-behandelten xenogenen Gruppe im Vergleich zur Gruppe D signifikant erhöht ist, ist unklar.

4.3.2. Mikrozirkulation

4.3.2.1. Störungen der Mikrozirkulation- mit und ohne Hemmung des Gerinnungssystems

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass die Hemmung des Gerinnungssystems zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit bei xenogenen Transplantationen in verschiedenen Tiermodellen führt. Unser Ziel war es, nach Veränderungen in der Mikrozirkulation zu suchen, die mit der Hemmung des Gerinnungssystems einhergehen und mit einer Verlängerung der Überlebenszeit des xenogenen Transplantates übereinstimmen könnten. Zwischen den Gruppen A, B und C, sowie D, E und F bestanden sowohl Übereinstimmungen, als auch signifikante Unterschiede:

Der sinusoidale Perfusionsindex war in der Gruppe F deutlich besser, als in den Gruppen D und E (Abb. 11-13). Bei Hemmung des Gerinnungssystems mit

Hirudin liess sich in der Gruppe F eine deutlich höhere azinäre Perfusion im Vergleich zu den anderen beiden xenogenen Gruppen nachweisen.

Das Verhalten der stagnierenden Leukozyten in den drei Zonen der Azini unterschied sich in den Hirudin behandelten Gruppen C und F, durch eine geringere Anzahl adhärenter Leukozyten in Relation zu den Vergleichsgruppen. (Abb. 10). Auch in den postsinusoidalen Venolen wies die Gruppe F eine niedrigere Anzahl an Leukozyten auf, als in den Vergleichsgruppen. Ebenso war der Verlust an Leukozyten und Thrombozyten im Perfusat in der Gruppe F im Vergleich zu Gruppe D und E am geringsten. Hirudin scheint also zu einer verminderten Thrombozyten-/ Leukozyten-Endothel-Interaktion zu führen und damit die Mikrozirkulation positiv zu beeinflussen. In den isogenen Gruppen B und C zeigte sich ein grösserer Abfall der Anzahl an Leukozyten und Thrombozyten im Perfusat, als in der Gruppe A. Die Freisetzung von Transaminasen und von LDH (Tab 7,8 und 10) war in der Gruppe E geringgradiger ausgeprägt.

Die histologischen Ergebnisse unterstreichen die Ergebnisse der azinären Perfusion und der Anzahl adhärenter Leukozyten während der Perfusion und im Perfusat. In den Gruppen E und F waren zum Einen weniger grosse Zellschäden zu erkennen, zum Anderen liessen sich deutlich weniger Leukozyten nachweisen, als in der Gruppe D, was auf eine deutliche Verbesserung der Mikrozirkulation der Rattenleber durch GPI 562 und Hirudin schliessen lässt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen kann nun unterteilt werden, welche Parameter von der Hemmung des Gerinnungssystems beeinflusst wurden und welche nicht.

Bei Hemmung des Gerinnungssystems durch den GPIIb/IIIa Antagonisten GPI 562 treten nur geringgradig weniger Perfusionsstörungen auf. Allerdings zeigt eine histologisch geringere Ausprägung der Hepatozytenschädigung, als auch eine laborchemisch bessere Hepatozytenfunktion durch die verringerte Freisetzung von Transaminasen. Bei einer Hemmung des Gerinnungssystems durch Hirudin kam es zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer

serologisch ähnlich stark ausgeprägten Hepatozytenschädigung, die Histologie wies allerdings deutlich bessere Ergebnisse auf. Durch GPI 562, als auch durch Hirudin lässt sich also eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen zumindest geringgradige Verbesserung der Mikrozirkulation, eine histologisch weniger ausgeprägte Hepatozytenschädigung, als auch eine Verbesserung der Hepatozytenfunktion, messbar an der laborchemisch weniger ausgeprägten Transaminasenerhöhung nachweisen. Die Verbesserung der Mikrozirkulation zeigt ebenfalls eine vergleichsweise nur geringgradig verminderte Leukozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation. Insgesamt sollte sich dadurch die hyperakute Abstossungsreaktion bei Xenotransplantationen verhindern, oder zumindest verzögern lassen.

In ähnlichen Versuchmodellen wurden bereits durch verschiedene Modifikationen Verbesserungen der Mikrozirkulation erreicht, jedoch blieb die Abnahme der Leukozyten und Thrombozyten im Perfusat unbeeinflusst. Wie resultiert eine Hemmung des Gerinnungssystems in der Verbesserung der Mikrozirkulation, so dass das xenogene Transplantat signifikant länger funktionieren kann?

Die Leber als stoffwechselaktives Organ ist mit einer Vielzahl an metabolisierenden Enzymen ausgestattet, die sowohl für den Substratabbau, als auch die Proteinsynthese verantwortlich sind. Eine Ischämie führt daher über das Absinken energiereicher Phosphate in den Hepatozyten zu zellulären Diffusionsstörungen. Hieraus resultiert eine Akkumulation von sauren Valenzen, die Aktivierung hypoxysensitiver Gene, eine mitochondriale Dysfunktion, die Unterbrechung der Proteinsynthese [29] und die intrazelluläre Aktivierung zelleigener lysosomaler Enzyme. Die Mikrozirkulation der Leber stellt einen guten Parameter für die intrazelluläre Funktion dar. Intravitalmikroskopische Untersuchungen haben in den letzten Jahren wesentlich zur Charakterisierung des I/R-Schadens der Leber beigetragen. Der I/R-Schaden der Leber ist gekennzeichnet durch sinusoidales Perfusionsversagen, durch die Akkumulation von Leukozyten im Bereich der

Sinusoide und postsinusoidalen Venolen und durch die Beeinträchtigung der hepatozellulären Funktion [66, 67]. Endotheliale Membranschäden führen zu Permeabilitätsstörungen und zur Aktivierung der sinusoidalen Endothelzellen. Der Verlust energiereicher Phosphate in den stoffwechselaktiven sinusoidalen Endothelzellen führt schnell zu einem Sistieren der Na^+/K^+ -Pumpe. Dadurch kommt es zu einer Diffusionsstörung. Freies Wasser fließt in die Zelle und führt zu einem Anschwellen der Endothelzelle. Die geschädigten Endothelien verlieren ihre antikoagulatorische Funktion und den Kontakt untereinander. Leakagen und interzelluläre Ödeme sind die Folge. Durch die Volumenzunahme kommt es zu einer Lumeneinengung der Sinusoide. Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass dieses zu einer Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion führt [52]. Die Hemmung des Gerinnungssystems scheint diese Kette zu unterbrechen und dadurch zu einer deutlichen Verbesserung der Mikrozirkulation zu führen. Eine physiologische Perfusion konnte jedoch nicht erreicht werden. Störungen der Mikrozirkulation bleiben trotz Hemmung des Gerinnungssystems bestehen.

4.3.2.2. Räumliche Verteilung der Perfusionsstörung

Bei der Betrachtung der drei verschiedenen Zonen eines Azinus fällt auf, dass es zu einer inhomogenen Verteilung der Perfusionsstörung kommt. Perfusionsausfälle wurden vorwiegend in der periportal Zone beobachtet (Abb. 7.1-3). Gleichzeitig war eine Adhäsion von Leukozyten in der periportal Zone deutlich stärker ausgeprägt, als in den anderen Zonen. Diese Ergebnisse wurden histologisch durch die Acetatesterase-Färbung bestätigt (Abb.12). Der Durchmesser der Sinusoide ist in der periportal Zone am kleinsten [50]. Leukozyten mit 8,5 μm im Durchmesser sind grösser als der Durchmesser der Sinusoide [6]. Diese Disproportion stellt ein mechanisches Hindernis für die Leukozyten dar. Unter physiologischen Bedingungen ändern die Leukozyten ihre Form und nehmen eine zylinderartige Gestalt an, um die

Engstelle zu überwinden [8]. Aktivierte Leukozyten scheinen jedoch einen Grossteil ihrer Flexibilität zu verlieren und so die Sinusoide zu verschliessen [8, 15]. Zusätzlich wurde in der periportalen Region die grösste Dichte an Gal 1-3 Gal-Epitopen gefunden [97]. Eine periportal betonte Adhäsion von Leukozyten wurde ebenfalls in Untersuchungen zum Ischämie/Reperfusionsschaden [105, 110] und zum hämorrhagischen Schock nachgewiesen. Durch welche weiteren Mechanismen Leukozyten zu einer Schädigung der Mikrozirkulation führen ist noch nicht endgültig geklärt.

4.3.2.3. Leukozyten/Endothel-Interaktion

In Mikrozirkulationsuntersuchungen der Leber beschreiben verschiedene Arbeitsgruppen eine massive Zunahme adhärenter Leukozyten in den Sinusoiden und in den postsinusoidalen Venolen im hämorrhagischen Schock [105], sowie nach Ischämie/Reperfusion [47]. Da die HXR zu einer Aktivierung der Endothelzellen führt [86], ist bei xenogener Perfusion ebenfalls eine sinusoidale und postsinusoidale Zunahme der Leukozytenadhäsion zu erwarten. Diese Interaktionen wurden in unserer Kontrollgruppe D ebenfalls gefunden. Wie ist allerdings zu erklären, dass die Leukozytenadhäsion in unseren Versuchsgruppen E und F teilweise im Vergleich signifikant erniedrigt ist?

Hirudin: Verschiedene Arbeitsgruppen [67] konnten in isogenen Ischämie/Reperfusionsmodellen zeigen, dass die Thrombozytenaggregation durch Hirudin signifikant gesenkt werden konnte [88]. Weitere Arbeitsgruppen konnten [48] eine Abnahme der Leukozyten/Endothel-Interaktion durch Hirudin in einem externen Perfusionsmodell nachweisen [43]. Hirudin bindet an die Fibrinogenbindungsstelle des Thrombins. Durch die eintretende Konformationsänderung im Thrombin-Molekül wird das aktive Zentrum des Thrombins durch das Hirudin blockiert. Auf diese Weise kommt es zur sehr wirksamen Hemmung sowohl des freien als auch des Fibrin-gebundenen Thrombins. Es verliert dadurch neben seiner zentralen Funktion in der plasmatischen Gerinnung auch seine Funktion als Thrombozyten-Aktivator.

Ferner konnte [54] in einem in vivo I/R-Model der positive Einfluss des Hirudins auf die über die CD 18-Integrin vermittelte Leukozytenadhäsion und die über präformiertes P-Selektin vermittelte Rolle der Leukozyten in den Lebersinusoiden nachgewiesen werden. In den postsinusoidalen Venolen jedoch konnten sie ebenfalls einen Einfluss des Hirudins auf die Leukozyten-Adhäsion zeigen, nicht aber auf das Rollen der Zellen [43].

GPI 562: Es gibt bereits Arbeitsgruppen, die nachweisen konnten, dass GPIIb/IIIa einen großen Einfluss sowohl auf die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion, als auch auf deren Aggregation hat [19]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung des GPIIb/IIIa-Rezeptors zu einer Verminderung der Thrombozyten- und Leukozyten-Aggregation als auch deren Aktivierung führt [31]. Ferner konnte gezeigt werden, dass die selektive GPIIb/IIIa-Hemmung mittels GPI 562 bei der xenogenen Transplantation eines Hamsterherzens in eine Lewis-Ratte einen positiven Einfluss auf das Überleben des xenogenen Transplantates hatte [19]. Auch in unseren Versuchen konnten wir verdeutlichen, dass GPI 562 einen positiven Einfluss auf die Anzahl adhärenter Leukozyten hat (Abb. 10,13).

4.3.3. Gallefluss

Der Gallefluss ist ein Parameter für die Funktion der Leber. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Produktion von Galle eine intakte Architektur der Lebersinusoiden und vitale Hepatozyten voraussetzt und somit einen brauchbaren Indikator für die Vitalität der Leber darstellt. (17, 44, 101).

In allen sechs Gruppen war der Gallefluss mit Beginn der Reperfusion stark rückläufig und hielt sich dann über den Zeitraum von 90 Minuten auf annähernd demselben Niveau. In der GPI behandelten Gruppe B war die Galleproduktion gegenüber der isogenen Kontrollgruppe signifikant erhöht. In Übereinstimmung mit der Perfusionsverbesserung in der Mikrozirkulation zeigte sich in der Hirudinbehandelten xenogen perfundierten Gruppe F im Vergleich zur Gruppe D sowohl ein höherer Ausgangswert, als auch eine höhere Galleproduktion

gegen Ende des Versuchszeitraumes. In der Gruppe E lagen im Vergleich zur xenogenen Kontrollgruppe D, lediglich während des Versuches geringgradig höhere Gallewerte vor. Der Ausgangs- und Endwert entspricht annähernd dem der Gruppe D. Selbst in der isogenen Gruppe A war der Gallewert gegen Ende des Versuches deutlich rückläufig (Abb. 14). Die Ergebnisse zeigen, dass die Perfusionsqualität nicht mit der Galleproduktion korreliert, möglicherweise liegen noch weitere Faktoren vor, die die Galleproduktion mitbeeinflussen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der hyperakuten Abstossungsreaktion (HXR), die bei xenogenen Transplantationen auftritt, auf die Mikrozirkulation der Leber zu untersuchen. Störungen in der Mikrozirkulation werden als Ursprung für die Organdysfunktion und letztlich für die Abstossung von xenogenen Transplantaten angesehen. Bisher war es nicht möglich diese Störungen während der Perfusion direkt zu quantifizieren.

Mit einem eigens zu diesem Zweck entwickelten Perfusionssystem gelang es uns, die Mikrozirkulation der Rattenleber ex vivo mittels Intravital-Floureszenz-Mikroskopie (IVM) zu beobachten. Zunächst wurde das Perfusionssystem evaluiert, um mögliche Einflüsse auf das Perfusat auszuschliessen. Anschliessend wurden Rattenlebern mit Ratten- (isogen) oder Humanblut (xenogen) als Kontrollgruppe perfundiert. Dann wurde zu jeweils einer isogenen Gruppe und einer xenogenen Gruppe der GP IIb/IIIa, GPI 562, in einer weiteren Gruppe Hirudin zugefügt, um so den Einfluss des Gerinnungssystems auf die Mikrozirkulationsstörungen erkennen zu können. Weiterhin konnten durch die IVM Leukozyten-Zell-Interaktionen sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Die Organfunktion wurde mittels der Galleproduktion und der Freisetzung von Enzymen (GOT, GPT, LDH und APH) kontrolliert. Nach Ende der Perfusion wurden Gewebeproben zur histologischen Aufarbeitung entnommen. In der isogenen Gruppe wurden kaum Perfusionsstörungen gefunden (sinusoidaler

Perfusionsindex; SPI: $0,99 \pm 0,025$), was für eine gute Funktion der Perfusionseinheit spricht. Bei der xenogenen Gruppe traten dagegen Störungen der Mikrozirkulation (SPI: $0,8 \pm 0,17$) auf.

Die Beeinflussung des Gerinnungssystems durch GPI 562 führte sowohl in der isogenen (SPI: $0,96 \pm 0,07$), als auch in der xenogenen Gruppe ($0,75 \pm 0,14$) zu einer geringfügigen Verschlechterung der Perfusion.

Unter Einfluss von Hirudin wies die isogene Gruppe (SPI: $0,99 \pm 0,04$) keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. In der xenogenen Gruppe (SPI: $0,88 \pm 0,11$) konnte eine nicht signifikante Verbesserung der Perfusion festgestellt werden.

Trotz Beeinflussung des Gerinnungssystems blieben Perfusionsdefekte bestehen. Die massive Adhäsion von Leukozyten an das Endothel während xenogener Perfusion konnte durch die Hemmung des Gerinnungssystems nicht verhindert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die alleinige Hemmung des Gerinnungssystems nicht ausreicht, um Mikrozirkulationsstörungen vollständig zu verhindern und somit eine vorübergehende Funktion von Xenotransplantaten als Assist-Device zu gewährleisten.

Mittels IVM konnte nachgewiesen werden, dass für die Mikrozirkulationsstörungen der Leber, die nach Hemmung des Gerinnungssystems fortbestehen, die Akkumulation von Leukozyten, als auch die Aggregation von Thrombozyten verantwortlich sind. Diese scheinen die Funktion und Überlebenszeit des xenogenen Transplantates zu limitieren.

Weitere Studien sind notwendig, um den Einfluss der Hemmung des Gerinnungssystems, der Leukozytenakkumulation und Thrombozytenaggregation auf die Funktion von xenogenen Organen zu untersuchen. Hierfür könnte man z.B eine kombinierte Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und bereits etablierteren GPIIb/IIIa-Antagonisten, wie z.B Abciximab, Lefradafiban,... durchführen. Auch sollte die Möglichkeit der Hemmung des

Fibrinogens mittels Tirofiban, oder eine Antaginisierung vom ADP-Rezeptor mittels Clopidogrel zu bedacht werden.

Eine weitere Option stellt die Kombination einer gleichzeitigen Hemmung des Gerinnungs- und des Komplementsystems dar. Die Möglichkeit einer Hemmung der hyperakuten Abstossungsreaktion so zum Beispiel mit dem Cobra Venom Faktor oder polyclonalen antithymozytären Globulinen konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [9, 70]. Eine Durchführung der Experimente mit ApoE-Mäusen, sollte ebenfalls erwogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Arkadopoulos N, Detry O, Rozga J, Demetriou AA. Liver assist systems: state of the art. *Int J Artif Organs*. 1998 Dec; 21 : 781-7
2. Atkinson JP, Oglesby TY, White D, Adams EA, Liszewski MK. Separation of self from non-self in the complement-system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin. Exp. Immunol* 1991; 86 (suppl 1): 27-30
3. Auchincloss H. Xenogeneic transplantation. *Transplantation*; 1988: 46: 1-20
4. Bach FH, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM, Vanhofe B, Blakely ML, von der Werf WJ, Hofer E, De Martin R, Hancock WW. Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol. Reviews*; 1994: 141: 5-30
5. Baily LL, Nehlsen-Cannaella SL, Conception W, Jolley WB, Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*; 1985: 254: 3321-3329
6. Barroso-Aranda J, Schmid-Schönbein GW, Zweifach BW, Engler RL: Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ. Res*. 1988: 63: 437-447

7. Bauer C, Marzi I, Bauer M, Fellger H, Larsen R. Interleukin-I receptor antagonist attenuates leukocyte-endothelial interactions in the liver after hemorrhagic shock in the rat. *Crit Care Med.* 1995; 23: 1099-1105
8. Bauer M, Marzi I, Thuma B, Bach F, Bühren V, Larsen R. Dose-related pattern of sinusoidal leukocyte adhesion in sublobular regions of the liver after systemic endotoxin challenge in the rat. *Shock*; 1994; 1:135-140
9. Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappell D, Hammer C. Morphological assessment of reperfusion injury in a concordant xenogeneic primate model. *Ann Transplant.* 2003; 8 (3): 50-2.
10. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today*; 1991; 12: 318-321
11. Björk J, Hugli T, Smedegart G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 1985; 134: 1115-1119
12. Bosch S., Arnauld C., Jestin A. Study of full length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J. Virol.* 2000 Sep; 74 (18): 8575-81.
13. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow- An index of ischemic injury. *J Surg. Res.* 1987 ;42 :565-569
14. Brauer RB, Baldwin WM III, Wang D, Pruitt SK, Klein AS, Sanfilippo F. Additional activity of anti-C6 antibodies elicited in C6-deficient rats reconstructed by liver allografts. *Transplantation*; 1996; 61: 588-594
15. Breddin HK & al. In vitro dose response to differentiate GPIIa/IIIb antagonists: inter-laboratory comparison of various platelet function tests. *Thromb. Res.* 2001;102:39-48
16. Brenner P, Reichenspurner H, Schmöckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meister B, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Hammer C, Reichart B. IG-Therasorb immunoapheresis in orthotopic xenotransplantation of baboons with landrace pig hearts. *Transplantation*; 2000; 69: 208-214

17. Butler D, Wadman M, Lehrman S, Schiermeier Q. Last chance to stop and think on risk of xenotransplantation. *Nature*; 1998; 391: 320-325
18. Calne RY, Davis DD, Pena JR. Hepatic allografts and xenograft in primates. *Lancet*; 1970; 1: 103-106
19. Candinas D, Lesnikoski BA, Hancock WW, Otsi I, Dalmaso AP, Robson SC und Bach FH. Inhibition of platelet integrin GPIIb/IIIa prolongs survival of discordant cardiac xenografts. *Transplantation*. 1996; 62: 1-5.
20. Chaussy CH, Hammer C, Eisenberger F, von Scheel J, Land W, Pielsticker K, Brendel W. Some aspects of the rejection of xenogeneic kidney transplants in different donor recipient combinations. *Europ. Surg. Res.* 1972; 4:262-271
21. Chen HM, Chen JC, Shyr MH, Chen MF, Hwang TF, Fan LL, Chi TY, Chi CP. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) attenuates reperfusion-induced hepatic microcirculatory derangement, energy depletion and lipid peroxidation in rats. *Shock* 1999; 12: 462-467.
22. Cozzi E, Bosio E, Seveso M, Vadori M, Ancona E. Xenotransplantation-current status and future perspectives. *Br Med Bull*, 2006 May 24; 75-76: 99-114
23. Cozzi E, White DJG. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Med*. 1995; 1:964-969
24. Dalmaso AP, Verceletti GM, Platt JL, Bach FH. Inhibition of complement mediated cytotoxicity by decay accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation*; 1991; 52: 530-533
25. Daniels LJ, Platt JL. Hyperacute xenograft rejection as an immunologic barrier to xenotransplantation. *Kidney Int*. 1997; 52. Suppl 58: S-28
26. Denner J., Specke V., Tacke S.. PERVs: diagnostics, adaptation to human cells by transmission to small animals, non-human primates and man. *Xenotransplantation* 2001, 126-127.

27. De Groot P.G., J.J. Sixma. Glykoproteinreceptors of the thrombocyte membrane : Biochemistry, molekularbiology und physiology. Blood; 1996, 88 (6): 2081-92
28. Despotis GJ, Hogue CW, Saleem R, Bigham M, Skubas N, Apostolidou I, Quayum A, Joist JH. The relationship between Hirudin and activated clotting time: implications for patients with heparin-induced thrombocytopenia undergoing cardiac surgery. Anesth. Analg. 2001 July: 93 (1): 28-32.
29. Dorling A, Lechler R. Disordered thromboregulation after xenografting. Current Opinion in Organ Transplantation, 2001:6 (1): 36-41
30. Farivar RS, Raymond H, Chen H, Adams DH. Xenotransplantation and the Endothelium. Graft 2001 4:355-364
31. Fiane AE, Videm V, Mollness TE, Hogasen K, Hovig T. Inhibition of platelet aggregation by the GPIIb/IIIa antagonist, Reopro, does not significantly prolong xenograft survival in an ex vivo model. Transplant Int. 1999; 12 (5):323-33.
32. Friedman EW, Milrod S, Frank HA, Fine J. Hepatic circulation in hemorrhagic shock in the rat. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 1953. 82: 636-638
33. Fukushima N, Gundry SR, Matsumiya G, Bouchart F, Zuppan C, Bailey LL. Histological findings in heart graft after orthotopic pig to baboon cardiac transplantation. Transplant. Proc. 1996. 28: 788-790
34. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal-antibody and the Gal(α 1-3Gal) epitope in primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. 84: 1369-1373
35. Gärtner K. Medizinische Laboruntersuchungen. 11. Auflage. 1995: 217
36. Giles GR, Boehmig HJ, Amemiya H, Halgrimson CG, Strazl TE. Clinical heterotransplantation of the liver. Transplant. Proc. 1970: 2: 506-512
37. Hammer C, Chaussy CH, Brendel W. Preformed natural antibodies in animal and man. Europ. Surg. Res. 1973. 5: 162-166

38. Hammer C, Csapo C, Höbel G, Müller U, Werdan K. Preformed natural antibodies: Action on endothelial cells. *Transplant- Proc.* 1992; 24: 590-591
39. Hammer C, Csapo C, Höbel G. Fixation of mammalian natural antibodies to porcine endothelial cells. *Transplant. Proc.* 1992; 24:588-589
40. Hammer C. Potentielle Barrieren der xenogenen Organtransplantation. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1998; 931-934
41. Hammer C, Csapo C, Höbel G. Fixation of mammalian natural antibodies to porcine endothelial cells. *Transplant. Proc.* 1992; 24:588-589
42. Herold al. *Innere Medizin.* 1997; 725
43. Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. The thrombin antagonist Hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Shock.* 2000 Nov; 14(5): 528-34
44. Hunt BJ, Dunning JJ, Segal H, Paratt R, White DJD, Wallwork J. Pig-to-human antibodies or complement? *Transplant. Proc.* 1994; 26:1156
45. Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P., Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH. Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models inhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat. med.* 1995 Nov, 1 :1189-94
46. Isacson O., Deacon T. Neural transplantation studies reveal the brains capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci* 1997; 20 :477-82
47. Ishikawa M, Cooper D, Arumugam TV, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism;* 2004, 24: 907-915.
48. Kamler M, Chatterjee T, Gebhard MM, Hagl S, Jakob H. Hirudin protects from leukocyte/endothelial cell interaction induced by extracorporeal circulation. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Jun 49: 157 61

49. Kimikawa M, Agishi T, Teraoka S, Suga H, Hayasaka Y, Ota K.
Prolongation of cardiac xenograft survival by double filtration
plasmapheresis and ex vivo xenoantibody adsorption. *Transplant. Proc.*
1992; 24: 447
50. Kinoshita T. Biology of complement: the overture. *Immunol. Today*;
1991; 12: 291-295
51. Komatsu h, Koo A, Guth PH.
Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation.
Microvasc. Research; 1990; 40: 1-13
52. Kondo T, Okamoto S, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K.
Application of a novel method for subsequent evaluation of sinusoids and
postsinusoidal venules after ischemia-reperfusion injury of a rat liver.
Eur. Surg. Res. 1998; 30: 252-258
53. Krombach F.
Molekulare Mechanismen der Leukozyten-Endothel- Interaktion.
Intensivmed. 1996; 33: 1-11
54. Kubes P, Payne D, Woodman RC.
Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in postischemic liver
microcirculation. *Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G139-147.
55. Lee JM, Tu CF, Tai HC, Chou NK, Yang TS, Weng CN, Lee CJ, Lee PH.
The hDAF Exogene Protects swine endothelial and peripheral blood
mononuclear cells from xenoreactive antibody mediated cytotoxicity in
hDAF transgenic pigs. *Transplant Proc.* 2006 Sep; 38 (7): 2270-2
56. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman
RM, Matas AJ. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of
complement. *Transplantation*; 1993; 55: 857-866
57. Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T,
Goldstein RM, Newman JT, Gonwa TA, Bancheau J, Diamond LE,
Bryne G, Logan J, Klintmalm GB. Liver allotransplantation after

- extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD 55/hCD59) porcine livers. *Transplantation*; 2000: 69: 272-280
58. Linke R, Diefenbeck M, Friedrich R, Seehofer D, Hammer C. Monitoring of microhemodynamic changes during ex vivo xenogeneic liver perfusion using intravital microscopy. *Transplant. Int.* 1998: 11: 259-265
59. Lou Y, Kosanke S, Miele L, Kobayashi T, LI SF, Niekrasz M, Shimizu A, Ye Y, Colvin RB, Cooper DKC, Comparative histopathology of hepatic allografts and xenografts in the nonhuman primate. *Xeno*; 1998: 5: 197-206
60. Makowka L, Wu GD, Hoffman A, Podesta L, Sher L, Tuso PJ, Breda M, Chapman FA, Cosenza C, Yasunaga C, Cramer DV, Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft. *Transplant. Proc.* 1994: 26: 1074-1075
61. Marzi I, Bauer C, Hower R, Leukocyte-endothelial cell interactions in the liver after hemorrhagic shock in the rat. *Circ. Shock*; 1993. 40: 105-114
62. Marzi I, Bauer M, Secchi A, Bahrami S, Redl H, Schlag G, Effect of anti-tumor necrosis factor on leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: an intravital microscopic study in the rat. *Shock*; 1995: 3: 27-33
63. McKencie IFC, Koulmanda M, Mandel T, Xing PX, Sandrin MS. Comparative studies of the major xenoantigen Gal $\alpha(1,3)$ gal in pigs and mice. *Tranplant. Proc.* 1995: 27: 247-248
64. Meijer DKF, Keulemans K, Mulder GJ. Isolated perfused rat liver technique. *Methods Enzymol.* 1981: 77: 81-94
65. Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy – bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol. Today*; 1993: 14: 519-522
66. Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of hepatic microcirculation in hamsters and rats.

- Eur. Surg. Res. 1991 : 23 : 158-169
67. Menger MD, Richter S, Yamouchi J, Vollmar B.
Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury.
Hepatogastroenterology 1999; Suppl 2: 1452-1457.
68. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation.
Microcirculation 2000; 7; 291-306.
69. Messmer K, Menger MD. Liver microcirculation and hepatobiliary function.
Progress in applied microcirculation. Basel: Karger, 1993; 1-172.
70. Meyer zu Vilsendorf A, Link C, Jorns A, Nagel E, Kohl J. Preconditioning
with the prostacyclin analog epoprostenol and cobra venom factor
prevents reperfusion injury and hyperacute rejection in discordant liver
xenotransplantation.
Xenotransplantation, 2001 Feb; 8 (1): 41-7
71. Mollnes TE, Fiane AE.
Role of complement in xenotransplantation.
Allergy, 2002; 57 Suppl 72: 75-8
72. Nishitani R, Ikai I, Terajima H, Kanazawa A, Takeyama O, Uesugi T,
Okabe H, Katsura N, Matsushita T, Yamanokuchi S, Matsuo K,
Sugimoto S, Shiotani T, Yamaoka Y.
Influence of extracorporeal porcine liver perfusion on nonhuman primates:
minimizing hemolysis improves subsequent survival.
Liver Transpl. 2001 July; 7: 615-22
73. Nowak G.
Hirudin: Pharmakologie und Therapie.
Semin Thromb Hemost, 1991 Apr; 17: 145-9. Review
74. Pascher A, Poehlein C, Storck M, Abendroth D, Müller-Höcker J, Young
VK, König W, White DJG, Hammer C.

- Human decay accelerating factor expressed on endothelial cells of transgenic pigs affects complement activation in an ex vivo liver perfusion model. *Transplant. Proc.* 1996; 28: 754-755
75. Pascher A, Poehlein C, Storck M, Prestel R, Müller-Höcker J, White DJ, Abendroth D, Hammer C.
Immunopathological observations after xenogeneic liver perfusions using donor pigs transgenic for human decay accelerating factor.
Transplantation; 1997; 64: 384-391
76. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA.
Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs.
Nature Med. 1997; 3: 282-286
77. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH.
Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation*; 1991; 52: 214-220
78. Poehlein C, Lemmens P, Schön MR, Neuhaus P, Thiery J, Hammer C.
Xenogeneic ex vivo hemoperfusion of rhesus monkey livers with human blood. *Transplant. Proc.* 1994; 26: 1061-1062
79. Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzales AP, Herfath C, Messmer K.
The impact of arterialization on hepatic microcirculation and leukocyte accumulation of liver transplantation in the rat.
Transplantation; 1992; 54: 789-794
80. Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzales AP, Palma P, Messmer K
New potentials of intravital fluorescence microscopy of the liver.
Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 1992 : 11 : 216.
81. Preuss T, Fischer N, Boller K, Tonjes RR. Isolation and characterization of an infectious replication-competent molecular clone of ecotropic porcine endogenous retrovirus class C.
Journal of Virology, 2006 Oct; 80 (20): 10258-61.
82. Rappaport AM.
The microvascular hepatic unit.

- Microvascular Research. 1973: 6: 212-228
83. Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU, Pearl M, Pearce CW, Dewitt CW, Smith PE, Hewitt RL, Flinner RL, Creech O:
Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg.* 1964;160: 384-410
84. Richter S, Yamaouchi JI, Minor T, Vollmar B, Menger MD.
Effect of warm ischemia time and organ perfusion technique on liver microvascular preservation in a non-heart-beating rat model.
Transplantation; 2000: 69: 20-24
85. Riedel GL, Scholle JL, Shepard AP, Ward WF.
Effects of hematocrit on oxygenation of the isolated perfused rat liver.
Am. J. Physiol. 1983: 245: G 769-G 774
86. Robinson LA, TU L, Steeber DA, Preis O, Platt JL, Teder TF.
The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: Implications for xenotransplantation.
J. Immunol. 1998: 161: 6931-6938
87. Robson SC, Candinas D, Hancock WW, Wrighton C, Winkler H, Bach FH. Role of endothelial cells in transplantation.
Int. Arch. Allergy Immunol. 1995: 106: 305-322
88. Roesken F, Vollmar B, Rucker M, Seiffge D, Menger MD.
In vivo analysis of antithrombotic effectiveness of recombinant hirudin on microvascular thrombus formation and recanalization.
J Vasc Surg. 1998; 28 (3): 498-505
89. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IFC.
Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(1-3)Gal epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993: 90: 11391-11395
90. Saumweber DM, Bergmann R, Gokel M, Hammer C.
Hyperacute rejection in an ex vivo model of renal xenografting.
Transplantation; 1994: 57: 358-363
91. Schelzig H., Abendroth D. Allogene Nierentransplantation: Technik und Komplikationen. *Viszeralchirurgie* 2004; 39: 443-451.

92. Schirmer WJ, Schirmer JM, Naff GB, Fry DE.
Allopurinol and Iodoxamide in complement-induced hepatic ischemia.
J. Surg. Res. 1988 : 45 : 28-36
93. Schirmer WJ, Schirmer JM, Naff GB, Fry DE.
Contribution of toxic oxygen intermediates to complement-induced
reductions in effective hepatic blood flow.
J. Trauma; 1988: 28: 1295-1299
94. Schirmer WJ, Townsend MC, Schirmer JM, Hamton WW, Fry DE.
Galactose clearance as an estimate of effective hepatic blood flow:
validation and limitations.
J. Surg. Res. 1986 : 41 : 543-556
95. Schmoeckel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ,
Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J, White
DJ. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model.
Transplantation; 1998:65: 1570-1577
96. Schmoeckel M, Nollert G, Schahmouhammadi M.
Prevention of hyperacute rejection by decay accelerating factor in
xenogeneic perfused working hearts.
Transplantation; 1996: 62: 729
97. Seehofer D, Baatz H, Thiery J, Müller-Höcker J, Müller-Derlich J,
Hammer C. Fluorescence videomicroscopic assessment of xenogeneic
microcirculation and impact of antibody removal by immunoadsorption.
Transplantation; 1997: 63: 460-465
98. Starzl TE, Marchioro TL, Peters GN, Kirkpatrick CH, Wilson WEC,
Porter KA, Rifkind D, Ogden DA, Hitchcock CR, Waddell WR.
Renal heterotransplantation from baboon to men: experience with 6 cases.
Transplantation; 1964: 2: 752-776
99. Storey RF, May JA, Wilcox RG, Heptinstall S.

- Monitoring the effects of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonist using a whole Blood Assay of Platelet Microaggregation: Comparison with other Aggregation Methodologies.
 Thrombosis and Haemostasis 1999; 82: 1307-1311.
100. Strock M, Abendroth D, White DJG, Pino-Chavez G, Fakler JA, Hammer C.
 Transgene Schweine als potentielle Organspender? Ergebnisse der Ex-vivo-Hämoperfusion hDAF-transgener Nieren mit Humanblut.
 Zentralbl. Chir. 1998; 123: 785-792
101. Suckfüll MM, Pieske O, Müdsam M, Babic R, Hammer C.
 The contribution of endothelial cells to hyperacute rejection in xenogeneic perfused working hearts.
 Transplantation; 1994; 57: 262-267
102. Thein E, Sevilmis G, Münzing S, Hammer C.
 Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs.
 Xenotransplantation, 2001; 8: 94-99
103. Ullman E. Tissue and organ transplantation.
 Ann. Surg. 1914; 60: 195-219
104. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K.
 Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intracellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence.
 Surgery; 1995; 117: 195-200
105. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K.
 Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. Am. J. Physiol. 1994; 270: G798-G803
106. Vollmar B, Richter S, Menger MD.
 Leukocyte stasis in hepatic sinusoids.
 Am J. Physiol. 1996; 270: G798-G803
107. Warrens AN, Simon AR, Theodore PR, Sachs DH, Sykes M.

Cross-species compatibility of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) with its ligands.

Transplantation; 2000: 69: 394-399

108. White DJG, Calne RY.

Xenotransplantation.

Chirurg. 1996: 67:324-330

109. Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti FN, Waterworth PD, Tolan MJ, Cozzi

E, Chavez G, Langford GA, Thiru S, Wallwork J, White DJ, Friend P.

Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using generally modified donors.

Transplantation; 1998: 65: 1584-1590.

110. Zhang JX, Jones DV, Clemens MG.

Effect of activation on neutrophil-induced hepatic microvascular injury in isolated rat liver.

Shock; 1994: 1: 273-278

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
APH	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BGA	Blutgasanalyse
CD	Cluster of differentiation
d.h.	das heißt
et al.	und Mitarbeiter
fHb	freies Hämoglobin
g	Gramm
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa

HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HXR	Hyperakute Xenogenen Abstossungsreaktion
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IU	International Units
IVM	Intravitalmikroskopie
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mz	midzonal
op	Operation
PERV	Pathologische endogene Retroviren im Genom von Schweinen
PnAK	präformierte natürliche Antikörper
pp	periportal
pz	perizentral
SD	Sprague Dawley
SEM	Standard error of mean (mittlerer Standardfehler)
ThV	Terminale hepatische Venole
TpV	Terminale portale Venole
UW	University of Wisconsin
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München, danke ich für die Aufnahme an das Institut, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der wissenschaftlichen Einrichtungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Überlassung des Themas, die gute und freundliche Betreuung sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. vet. E. Thein für die gute Betreuung und Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Mühlbayer danke ich für die Durchführung der Biochemischen Untersuchungen am Institut für Klinische Chemie der LMU München, Klinikum Grosshadern.

Herrn Dr. med. H. Terajima und Dr. med. R. Linke danke ich für die Einführung in den experimentellen Abschnitt der Arbeit.

Für die Durchführung der Histologie und der FACS-Analysen danke ich Frau S. Münzing.

Für die technische Unterstützung und stete Hilfe danke ich Frau G. Höbel und A. Allmeling.

Weiterhin Danke ich allen Doktoranden, Assistenten und Dozenten des Instituts, die durch ihr Interesse und ihre Anregungen zum Gelingen der Arbeit entscheidend beigetragen haben.

9. Lebenslauf



Name: Güler Sevilmis

Geburtsdatum: 08.12.1974 in Bielefeld, Deutschland

Eltern: Suzan und Mömin Sevilmis

Schulbildung:

1981-1985 Grundschule, Am Sudbrack, Bielefeld

1985-1991 Luisen-Realschule, Bielefeld

1991-1994 Helmholtz-Gymnasium, Bielefeld

1994 Abitur

Studium:

1995/96-1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München

3/1998 Ärztliche Vorprüfung

1999-2003 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München

1998 Beginn meiner experimentellen Dissertation in der Transplantations- und Mikrozirkulationsforschung am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, unter der Leitung von Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

3/2000 Erstes Staatsexamen

8/2002 Zweites Staatsexamen

11/2004 Drittes Staatsexamen

- 1998-2004 Studentische Mitarbeiterin,
Medizinische Poliklinik, LMU-München
Abteilung für Infektiologie
(Leitung: Prof. Dr. med. J. Bogner)
- Praktisches Jahr:**
- 10.02-07.03 TU, Klinikum der Barmherzigen Brüder, München
Abteilung Chirurgie,
- 02.03-5.03 TU, Klinikum der Dermatologie und Allergologie am
Biederstein, München
- 06.03-07.03 Mount Sinai Hospital, New York, USA
Department of Gastroenterology + Department of
Infectious Diseases
- 07.03-09.03 Deutsches Herzzentrum, München, Kardiologie
- 03.04-10.04 **Ärztin im Praktikum**, Medizinische Poliklinik der
LMU, München, Abteilung Kardiologie
- Seit 10.04 **Assistenzärztin**, Medizinische Poliklinik der
LMU, München, Abteilung Kardiologie