

# **Experimenteller Vergleich des Bioimpedanzverhaltens der ischämischen Rattenleber in Abhängigkeit von Protektionsverfahren und Temperatur**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Felix Schad**

aus Wuppertal

2023

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ. Prof. (em) Dr. med Claus Jürgen Preusse

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jakob Nattermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.07.2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Farhad Bakhtiary

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Historische Entwicklung der Leberchirurgie.....	6
1.2 Protektionsverfahren .....	7
1.3 Die elektrische Impedanz.....	9
1.4 Gap Junctions .....	10
1.5 Fragestellung und Zielsetzung .....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Versuchstiere, Narkose und Präparation des Situs .....	13
2.2 Apparativer Aufbau des Impedanzspektroskops .....	15
2.3 Perfusionslösungen .....	16
2.4 Statistik .....	18
2.5 Impedanzmessung.....	18
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1 Reine Ischämie bei 35 °C (n=2) im Vergleich zu 5 °C (n=3) .....	22
3.2 Leberischämie bei 5 °C unter verschiedenen Protektionsbedingungen .....	28
3.3 HTK (n=13) im Vergleich mit Heptanol (n=2) während Ischämie bei 5 °C.....	36
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>39</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>6 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>63</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase (Enzym)
°C	Celsius
Cm	Kapazität der Zellmembran
Cm'	Membrankapazität der Doppelmembran zweier benachbarter Zellen
$\epsilon$	Permittivität
EZRI	Extrazellulärraumindex
f	Frequenz
g	Gramm
GJV	Gap Junction Verschluss
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
HCL	Salzsäure
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (Protektionslösung)
Hz	Herz
IGL	Institute- Georges-Lopez (Protektionslösung)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
$\sigma$	Konduktivität
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
Re	Extrazellulärer Widerstand
Re'	dünne Flüssigkeitsschicht zwischen den Membranen
Rg	Gap Junction Widerstand

R <sub>i</sub>	Intrazellulärer Widerstand (Zytosol)
R <sub>m</sub>	Membranwiderstand
t	Zeit
t-in	Zeit bis zum oberen Umschlagpunkt in $\mathcal{E}'$
UW	University- Wisconsin (Protektionslösung)
$\omega$	Kreisfrequenz ( $=2\pi f$ )
V.	Vena
Z	Impedanz

# 1 Einleitung

## 1.1 Historische Entwicklung der Leberchirurgie

Im Rahmen des medizinischen Fortschritts nimmt auch die Transplantationschirurgie von Organen einen wichtigen Platz ein.

Die Leber- und Pfortaderchirurgie und die daraus resultierenden Erkenntnisse und Entwicklungen gewannen erst im letzten Jahrhundert an Bedeutung. Aufzeichnungen über erste Versuche in der Leberchirurgie gibt es von Hildanus (1560 - 1643) und Harvey (1578 - 1656). Die erste erfolgreiche dokumentierte Leberteilresektion führte Hildanus in Folge einer traumatischen Leberschädigung durch. Die erste geplante Linksresektion der Leber erfolgte 1888 durch K. Langenbuch (Hardy, 1990; Reith, 1995).

Durch die beiden Weltkriege wurde die weitere Entwicklung der Leberchirurgie zunächst verzögert. In der Mitte der 50er Jahre wurde durch die Darstellung der Topographie der intrahepatischen Gallenwege von Hjortsjö (1951), die Erkenntnisse von Healy zur Anatomie der Leberarterie (1953) und von Couinaud zur Segmentanatomie der Leber (1954) ein weiterer Durchbruch erzielt (Couinaud, 1954; Healy und Schroy, 1953). 1968 gelang Tom E. Starzl die erste orthotope Lebertransplantation (Hardy, 1990).

Die Fortschritte auf dem Weg zur modernen Leberchirurgie konnten durch die genauere Kenntnis der Anatomie und Topographie der Leber, sowie die stetige Optimierung der Operationsverfahren, und die Verbesserung von Narkose und postoperativer Betreuung erzielt werden.

Peri- und postoperative Komplikationen konnten durch den Einsatz protektiver intraoperativer Maßnahmen (z.B. Hypothermie und verschiedene organspezifische Protektionslösungen) verringert werden. Spannend dabei ist, im Unterschied zu anderen Organen, dass eine Resektionsfähigkeit der Leber bis zu 80 % möglich ist und die Leber über eine enorme Regenerationsfähigkeit bis näherungsweise zu ihrem Ausgangsgewicht verfügt (Karp, 2009; Michalopoulos und DeFrances, 2005).

Das Ziel der Forschung ist darauf fokussiert, die Morbidität und Letalität in der Lebertransplantationschirurgie zu senken, wozu umfangreiche perioperative Maßnahmen beitragen können. Dazu gehört die Weiterentwicklung operativer Techniken, die intraopera-

tive Anwendung verschiedener Organprotektionsverfahren und die postoperative Betreuung (Lueck et al., 2016; Mellert et al., 2011, Preusse et al., 1982; Schad, 1990).

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene intraoperative Protektionsverfahren für die ischämische Rattenleber im Tierversuchsmodell mittels der elektrischen Impedanz analysiert.

## **1.2 Protektionsverfahren**

Bei Eingriffen am offenen Herzen ist der Vorteil der Nutzung verschiedener kardioplegischer Lösungen bzw. Verfahren im Vergleich zur reinen Hypothermie aufgrund zahlreicher Studien gesichert (Braathen et al., 2011; Schad, 1990; Scrascia et al., 2011). Dabei ist die Organprotektion durch die Lösungen auf den Metabolismus, die Organstruktur und die Funktion während der Ischämie gerichtet.

Die heutzutage weltweit eingesetzten Kardioplegie-Lösungen unterscheiden sich deutlich in Bezug auf ihre Zusammensetzungen. Grundsätzlich kann zwischen bluthaltigen und kristallinen Lösungen unterschieden werden. Die in Deutschland am häufigsten angewandte Lösung in der Herzchirurgie ist die HTK-Lösung nach Bretschneider, die natriumarm und mit einem Aminosäuren-Puffer versehen ist.

Nachdem die HTK-Lösung Custodiol® zunächst nur in der Herzchirurgie zur Anwendung kam, wurde sie in den 80er- Jahren auch im Rahmen von Lebertransplantationen eingesetzt.

Zur Leberprotektion wird international vorwiegend die UW- Lösung nach Belzer verwendet. Sie ist natrium- und kaliumreich und enthält hochenergetische Phosphate zur Minderung der intrazellulären Azidose. Der Zusatz von HAES soll der Ödementwicklung in der Leber entgegenwirken, erhöht aber auch gleichzeitig die Viskosität der Lösung (Cavallari et al., 2003; Lema Zuluaga et al., 2013).

In Deutschland wird zur Leberprotektion adäquat zur Myokardprotektion überwiegend die Bretschneider Lösung eingesetzt. Neben der bereits erwähnten "Natrium- Armut" zeichnet sich diese Lösung durch eine niedrigere Viskosität aus, wodurch eine schnellere Durchspülung des Organs und eine Verringerung von Vasospasmen während der

Reperfusion gewährleistet ist (Lamesch et al., 1991; Ringe et al., 2005; Wiederkehr et al., 2014). Weiterhin enthält sie in hoher Konzentration einen Histidin- Puffer der die Ischämie bedingte Azidose (Laktatbildung) reduziert und darüber hinaus noch als Radikalfänger fungiert, sowie einen Zusatz von Ketoglutarat und Tryptophan zur Membranstabilisation.

Neben den beiden genannten Lösungen wird heute in zunehmendem Umfang die 1997 entwickelte Lösung IGL (Institute Georges-Lopez) europaweit verwendet. Diese Lösung zeichnet sich durch eine geringe Viskosität und eine im Vergleich zur UW-Lösung geringere Natrium- und Kalium- Konzentration aus. Die Besonderheit liegt in der Verwendung von Glutathion, welches die antioxidativen Eigenschaften der IGL- Lösung verstärken soll (Jain et al., 2003).

Die unterschiedlichen Protektionslösungen wirken auf den Metabolismus des ischämischen Organs. Ischämie führt zu einer Hemmung der Natrium- Kalium ATPase der Zellmembran. Daraus resultiert eine intrazelluläre Natrium- Akkumulation mit Ausbildung einer intrazellulären Azidose und eines konsekutiven intrazellulären Ödems. Der ischämische Zellschaden wird durch Anwendung der protektiven Lösungen abgeschwächt (Adam et al., 2015; Ben Mosbah et al., 2006; Cavallari et al., 2003; Erhard et al., 1994; Fingas et al., 2011; Lema Zuluaga et al., 2013; Meine et al., 2006).

Diese sollen durch ihre Zusammensetzung in der ischämischen Phase auf unterschiedliche Weise die Azidose mindern und der Ödementwicklung entgegenwirken. Die Untersuchungen zur Organprotektion basieren auf Experimenten mit verschiedenen Tierspezies. Kehrer untersuchte bereits 1990 die besondere Eignung der Schweineleber für Leberperfusionsexperimente im Vergleich zur Schafsleber. Die Rattenleber, die in unserer Versuchsanordnung genutzt wurde, ist besonders repräsentativ für andere Spezies aufgrund ihrer anatomischen Gleichverteilung der Leberlobuli und deren elektrischer Homogenität (Gersing et al., 1991; Kehrer, 1990,1993).

Um die Effizienz eines Protektionsverfahrens tierexperimentell zu untersuchen, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an: histologische Untersuchungen zur Darstellung des eingetretenen Zellschadens, Analysen der Leberenzyme (intra- und postoperativ), Aktivitäten der Kreatin-Kinase als Marker sinusoidaler Endothelschädigungen, postoperative

Messungen des Gallenflusses und der Gallenproduktion als Marker des Aktivitätszustandes der Hepatozyten, Messung von Ionenverschiebungen und pO<sub>2</sub>- Verläufen im Perfusat, sowie Messung von ATP- und Glykogengehalt des Gewebes.

Ein weiteres Verfahren stellt die Messung der bioelektrischen Impedanz des ischämischen Organs dar.

### **1.3 Die elektrische Impedanz**

Mit der elektrischen Impedanz werden Veränderungen der passiven elektrischen Eigenschaften von Organen während Ischämie gemessen, wodurch Rückschlüsse auf den Gewebeschaden und somit die Effizienz der verwendeten Protektionsverfahren gezogen werden können (Ellenby et al., 1987; Erhard et al., 1993; Gebhard et al., 1987; Gersing, 1982; Lambotte et al., 1978; Lueck et al., 2016).

Unter der elektrischen Impedanz von Gewebe versteht man den Widerstand, den das Gewebe einem Wechselstrom entgegensetzt. Es gibt erprobte und in der Anwendung sehr einfache Methoden zur Messung der Impedanz (Gersing et al., 1991). Der große Vorteil dieser Messmethode besteht darin, dass sie für Gewebe atraumatisch ist und dass die Ergebnisse innerhalb von Sekunden vorliegen. Die Entnahme von Gewebeproben und Analysezeiten, wie sie für histologische und biochemische Untersuchungen notwendig sind, entfallen (Linhart, 1995).

Da es während der Ischämie zu Elektrolyt- und vor allem Flüssigkeitsverschiebungen zwischen dem Intra- und Extrazellularraum kommt, werden die Stromflüsse und die daraus resultierenden Spannungsveränderungen beeinflusst. In erster grober Näherung kann festgestellt werden, dass der Strom bei niedrigen Frequenzen vornehmlich durch den Extrazellularraum fließt. Die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran können als Kondensatoren beschrieben werden, die den Stromfluss durch die Zellen beeinträchtigen bzw. verhindern. Bei hohen Frequenzen geht der kapazitive Widerstand eines Kondensators gegen "0" und führt somit sowohl zu einem extra- als auch intrazellulären Stromfluss. Veränderungen des extrazellulären Milieus werden bei niedrigen Frequenzen erfasst und als Ohmscher Widerstand bezeichnet. Vor dem Hintergrund dieser Aus-

führungen lassen sich Veränderungen des Gewebes frequenzabhängig mithilfe der elektrischen Impedanz erfassen.

Ein aufgetretenes Ödem stellt sich als Indikator des Ischämieschadens unter anderem durch die Verschiebung der Flüssigkeit nach intrazellulär dar, was bei der Impedanzmessung mit dem Extrazellularraumindex (EZRI) abgeschätzt werden kann. Zusätzlich mehren sich die Hinweise, dass die Impedanzmessung eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Gap Junctions sein dürfte.

#### **1.4 Gap Junctions**

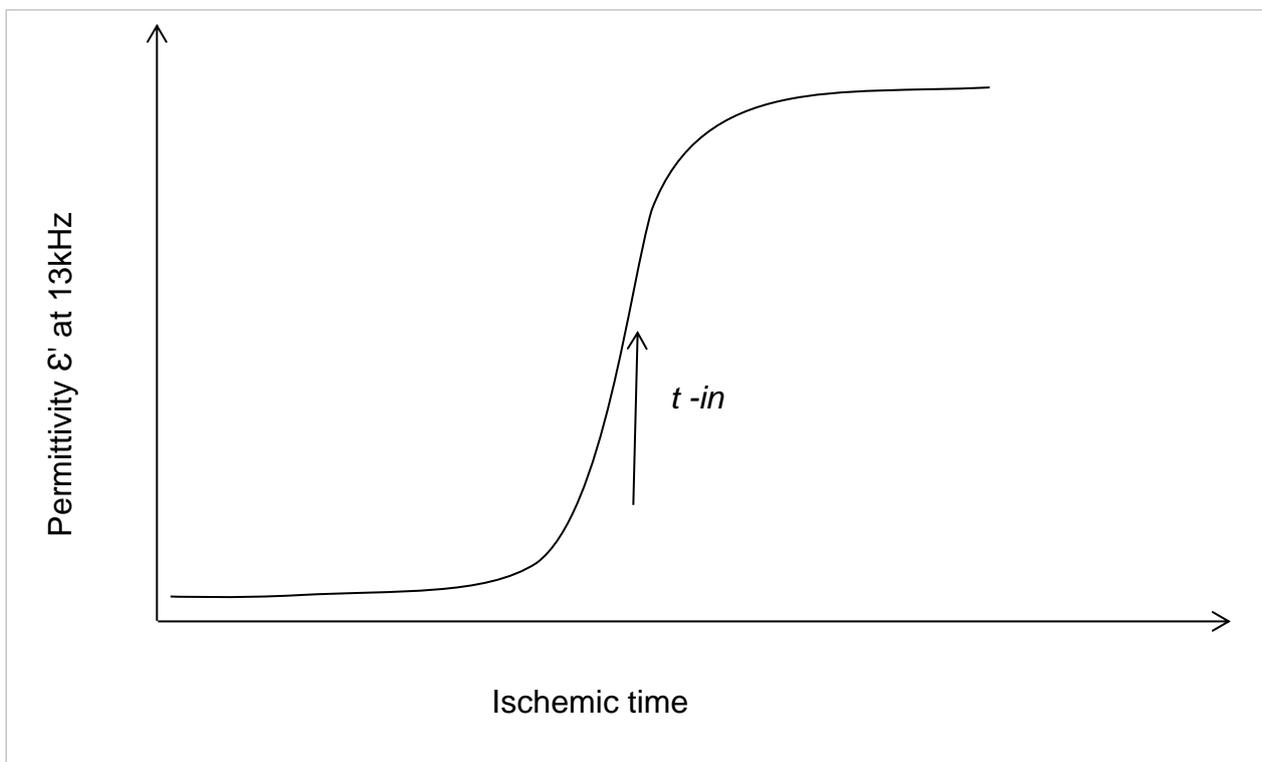
Gap Junctions stellen eine direkte, an Zellkontakten lokalisierte Verbindung des Zytoplasmas benachbarter Epithelzellen dar (Loewenstein et al., 1964).

Im Rahmen weiterer Untersuchungen konnten die Gap Junctions als das morphologische Korrelat interzellulärer Kommunikation bestätigt werden (Klaunig und Ruch, 1990; Makowski et al., 1984; Severs, 1990; Spray und Burt, 1990; Unwin, 1980,1987; Wright, 1988). Durch die Weiterentwicklung der Elektronenmikroskopie konnte dargestellt werden, dass die Zellmembran Kanäle, so genannte Connexone enthält, die mit entsprechenden Connexonen benachbarter Zellen kommunizieren und so das Zytoplasma benachbarter Zellen durch einen hydrophilen Kanal (Gap Junction) untereinander verbindet (Goodenough und Gilula, 1974; McNutt und Weinstein, 1970). Gap Junctions dienen dem Austausch von Ionen, Signalstoffen und Metaboliten, und der Erhaltung der zellulären Homöostase und der Volumenregulation (Kehrer, 1993; Loewenstein, 1987; Verselis et al., 1986). Bei geringer Gewebsschädigung gleicht die Kopplung der Gap Junctions chemische und elektrische Potentialdifferenzen aus und stabilisiert somit den Zellverbund. Je länger eine Ischämiebelastung andauert und ein kritisches Maß übersteigt, kommt es zu einem Verschluss der Gap Junctions und somit zu einer Abkopplung der Zellen untereinander, wodurch anzunehmender Weise die Überlebenschance einer vitaleren Zelle erhöht wird. Nach Engelmann (1875, 1877) ergibt sich, dass die Zellen gemeinsam leben, aber einzeln sterben.

Durch Untersuchungen mittels Mikroelektroden am Herzen fanden sich Hinweise, dass der Widerstand der Gap Junctions im Verlauf von Hypoxie und Ischämie ansteigt

(Argentieri et al., 1990; De Mello, 1987; Gettes, 1986). Kehrer et al. gelangten zu der Hypothese, dass nur bei Gewebe, dessen Zellen über Gap Junctions gekoppelt sind, im Laufe der Ischämie ein steiler Anstieg der Impedanz bei niedrigen Frequenzen beobachtet werden kann und hierfür ein Verschluss der Gap Junctions ursächlich sein könnte (Kehrer et al., 1990).

Lück et al. (2016) demonstrierten bei Untersuchungen an neonaten und adulten Schweinherzen bei 13 kHz, den für den Gap Junction Verschluss typischen sigmoidalen Anstieg der DZ (Abb.1). Gleichzeitig postulierten sie anhand ihrer Messungen des Extrazellulärraums einen zeitlichen Zusammenhang mit Gap Junction Verschlüssen, da dieser parallel zum Anstieg der DZ im gleichen Zeitverlauf abfällt (Kaushal und Wehmann, 2016).



**Abb. 1:** Schematic diagram of a stylized sigmoidal time course of the dielectric permittivity  $\epsilon'$  at 13 kHz during myocardial ischemia. The time point  $t_{-in}$  represents the breakpoint of the curve.  $\epsilon'$  Permittivity;  $t_{-in}$ , time up to the point of inflexion, in  $\epsilon'(t)$  (Lueck et al., 2016).

Ein Gap Junction Verschluss ist zu anzunehmen, wenn während der Ischämie eines Organs eine Änderung der interzellulären Leitfähigkeit eintritt (Kehrer, 1993). Untersuchungen durch Schaefer et al. (2002) unterstützen diese Vermutung. Bezogen auf *Abb. 1* bedeutet dies, dass die Zeit bis zum Umschlagpunkt in  $\mathcal{E}'$  (t-in) die Latenz darstellt, bis der GJV während Ischämie auftritt.

### 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Um die Qualität der Protektionslösungen bei der Lebertransplantation beurteilen zu können, nutzten wir in dieser Arbeit die Methode der elektrischen Impedanzmessung. Mit dieser Methode ist es möglich, die passiven elektrischen Eigenschaften an der Rattenleber während der Ischämie zu erfassen. Dazu haben wir die Veränderungen des EZRI - ein Indikator der Ödembildung - und den Zeitpunkt des Gap Junction-Verschlusses gemessen, sowie die Änderungen der Leitfähigkeit (Permittivität  $\mathcal{E}$  und Konduktivität  $\sigma$ ) erfasst.

Da die Regenerationsfähigkeit eines ischämischen Organs wesentlich von den Ischämie- bedingten Schädigungen abhängt (Kehrer, 1993), stehen mehrere Parameter zur Verfügung, die Qualität des Protektionsverfahrens zu beurteilen. Dazu gehören Bestimmung des Energieumsatzes, der Morphologie, der Azidose- Entwicklung (pH-Messung), des intraintrischämischen Metabolismus, sowie Analyse der postischämischen Funktion. Ein weiteres Verfahren zur Überprüfung der Protektionseffektivität stellt die Messung der elektrischen Impedanz dar, die in zahlreichen experimentellen Untersuchungen am Herzen durchgeführt wurde (Jain et al., 2003; Knapp et al., 2005; Padilla et al., 2003; Schaefer et al., 2019). In der vorliegenden Untersuchung wurde dieses Verfahren auch an der ischämischen Leber angewendet. Dazu wurde nicht nur der Einfluss der Temperatur (35°C und 5°C) bei reiner Ischämie untersucht, sondern auch der Einfluss verschiedener Protektionslösungen (IGL, UW und HTK) bei 5 °C verglichen. Nach unserer Kenntnis wurden bislang keine Impedanzmessungen an der Leber durchgeführt, die den Vergleich der untersuchten Protektionslösungen HTK, IGL und UW unter tiefer Hypothermie zum Inhalt hatten.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, mittels der elektrischen Impedanzmessung die Qualität der Protektionslösungen für die Leber zu evaluieren und in Relation zur Lösungszusammensetzung zu bringen.

## 2 Material und Methoden

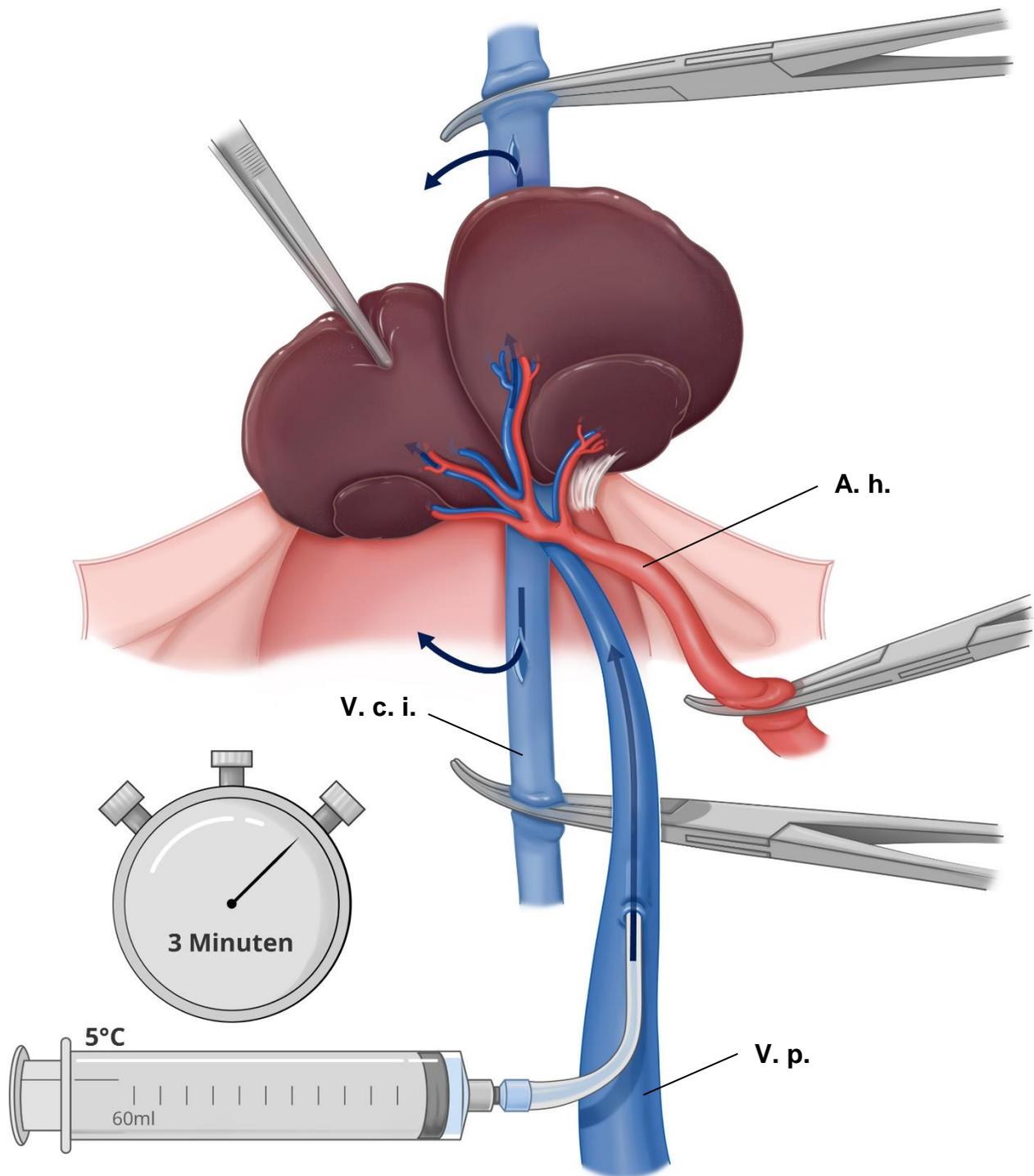
### 2.1 Versuchstiere, Narkose und Präparation des Situs

Insgesamt wurden 43 Versuche an Rattenlebern durchgeführt. Dazu wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200 - 300 g verwendet. Alle Tiere wurden entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten (Fassung 2006 §1+2). Auf eine artgerechte Haltung im institutseigenem Tierbereich bis zum Versuchsbeginn wurde strikt geachtet. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser, Nahrung und hatten eine ausreichende Käfiggröße. Ebenso wurde der 12 Stunden Tag- Nacht Rhythmus eingehalten.

Zur Inhalationsnarkose wurde Isofluran (Isofluran 4 %) verwendet. Das Spendertier wurde nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe in Rückenlage fixiert. Eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (75mg/kg KG) diente zur zusätzlichen Analgesie. Über eine mediane Laparotomie wurde danach das Abdomen eröffnet und die Aorta des Tieres inzidiert.

Das Tier verstarb durch Entbluten in tiefer Narkose. Danach erfolgte eine rasche in-situ Kanülierung der Pfortader mit anschließender Perfusion der Leber mit 60ml 5°C kalter Protektionslösung. Die Applikation der jeweiligen Protektionslösungen wurde manuell über 3 Minuten vorgenommen. Bei den Versuchen mit reiner Ischämie entfielen Kanülierung und Perfusion. Die A. hepatica und die V. cava inferior waren zu Beginn der Perfusion ligiert worden. Als Abflussweg der Perfusionslösung wurde die V. cava inferior verwendet (*Abb. 2*).

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Zwerchfell gespalten, der infra- und suprahepatische Teil der V. cava inferior durchtrennt und die Leber sorgfältig von Diaphragma, Magen, Ösophagus und retroperitonealem Bindegewebe freigelegt. Im Anschluss daran wurde die Leber entnommen und in einem Thermostaten bei 35°C bzw. 5 °C inkubiert.



**Abb. 2:** Darstellung des operativen Situs und der technischen Abläufe. Kanülierung der Pfortader (V. p.), Ligierung der Arteria hepatica (A. h.) und der Vena cava inferior (V. c. i.), Eröffnung der Vena cava inferior (V. c. i.) als Abflußweg für die Perfusionslösung.

## 2.2 Apparativer Aufbau des Impedanzspektroskops

Die elektrischen Impedanzmessungen wurden in einer temperierbaren Messkammer über einen Messkopf mit vier parallel liegenden Elektroden durchgeführt, der nicht invasiv auf der Leberoberfläche über den gesamten Messzeitraum fixiert war. Dadurch konnten kontinuierlich Messungen erfolgen. Es wurde der Messkopf des Instituts für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. genutzt, welcher mit 4 Elektroden auf einem Gummipfropf bestückt war. Dieser wurde in einem Glasbehälter mit Teflondeckel eingebracht und an das Messgerät angeschlossen.

Der Abstand zwischen den Spannungselektroden betrug 2,8 mm, der Abstand zwischen Spannungs- und Stromelektrode betrug 0,8 mm. Jede Elektrode hatte eine Fläche von 1,2 mm Breite auf 5 mm Länge. Um Polarisationsfehler der Impedanzmessung im niedrigen Frequenzbereich zu minimieren, wurden die Elektroden mit einer fraktalen Oberfläche aus Iridiumoxid ummantelt (Gersing et al., 1995).

Zur Messung wurde ein Impedanzanalysator der Firma Solartron 1260 mit der Software ImpDAQ V1.03 iba e.V. (Solartron Analytical, Leicester, United Kingdom) oder das Handyscope HS5 (TiePie, Sneek, Netherlands) benutzt. Über die beiden außen liegenden Elektroden wurde in fünfminütigen Abständen ein Wechselstrom appliziert und über die innen liegenden Elektroden die jeweilige Spannung erfasst und registriert. Dies wurde für unterschiedliche Frequenzen zwischen 100 Hz und 1 MHz durchgeführt. Die Dauer einer Einzelmessung über den gesamten Messbereich betrug 3-5 Sekunden.

## **2.3 Perfusionslösungen**

### **HTK Lösung nach Bretschneider**

„Custodiol“, eine Natrium- und Kalium- und vor allem Calcium-arme, Histidin-gepufferte Lösung der Firma Dr. Franz Köhler Chemie GmbH.

Die HTK - Lösung nach Bretschneider (Custodiol®) wird vor allem zur Kardioplegie bei kardiochirurgischen Operationen verwendet.

### **HTK-N - Lösung**

Eine Eigenentwicklung der Firma Dr. Köhler Chemie Bensheim. Diese Lösung enthält anstelle des Histidin - Histidin-HCL Puffers einen N-Acetylhistidin- Puffer, Aminosäuren und Eisenchelatoren.

### **IGL-1**

Institute Georges-Lopez- 1 Protektionslösung, neue Protektionslösung für die Leber mit niedrigem Kaliumgehalt und niedriger Viskosität

### **UW (Lösung zur Kaltlagerung nach Belzer)**

University of Wisconsin, Standardlösung für Lebertransplantationen mit hoher Viskosität und hohem Kaliumgehalt

**Tab. 1:** Die unterschiedlichen Zusammensetzung der verwendeten Protektionslösungen: HTK, HTK-N, IGL und UW mit ihren Inhaltsstoffen, der Osmolarität und dem pH-Wert

<b>Substanzen</b>	<b>HTK</b>	<b>HTK- N</b>	<b>UW</b>	<b>IGL</b>
Natrium [mmol/l]	15	15	30	120
Kalium [mmol/l]	9	10	125	30
Chlorid [mmol/l]	78	74		20
Calcium [mmol/l]	0,015	0,02		
Magnesium [mmol/l]	4	8	5	5
Phosphat [mmol/l]			25	25
Sulfat [mmol/l]			5	5
Lactobionate (mmol/l)			100	100
HAES [g/l]			50	
Raffinose [mmol/l]			30	30
Mannitol [mmol/l]	30			
Histidin [mmol/l]	180			
Histidin - HCL [mmol/l]	18			
N-Acetylhistidin [mmol/l]		181		
Tryptophan [mmol/l]	2	2		
Ketoglutarat [mmol/l]	1	2		
Glukose [mmol/l]				
Insulin [U/l]			100	
Penicillin [U/l]			200	
Adenosin [mmol/l]			5	5
Allopurinol [mmol/l]			1	1
Dexamethason [mg/l]			8	
Glutathion [mmol/l]			3	3
Polyethylen glycol [mmol/l]				0,03
pH bei 25°C	7,1		7,4	7,4
Osmolarität	291		320	320

## 2.4 Statistik

Die ermittelten Messergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Der statistische Vergleich zwischen den Versuchsgruppen wurde je nach Ergebnis mit parametrischen oder nicht-parametrischen Tests durchgeführt. Als parametrischen Test nutzten wir den zweiseitigen T-Test für unabhängige Variablen bezüglich der verschiedenen Bedingungen.

Da zur Gegenüberstellung der Protektionslösungen mehrere Gruppen miteinander verglichen wurden, mussten zusätzlich (sofern die Voraussetzungen erfüllt waren) einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt werden. Um eine ANOVA anzuwenden, muss unter anderem die Voraussetzung erfüllt sein, dass die Varianzhomogenität zwischen den Gruppen gegeben ist. Dies wird mit dem Levene-Test überprüft und setzt voraus, dass dieser Test nicht signifikant werden darf. Sofern Varianzhomogenität besteht, können die Werte der ANOVA genutzt werden. Ist der P-Wert signifikant, bestehen auch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Um festzustellen zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen, berechneten wir dies anschließend mit dem durchgeführten Tukey-Post Hoc Test. Signifikante Unterschiede wurden angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit 5 % oder weniger betrug ( $p \leq 0,05$ ).

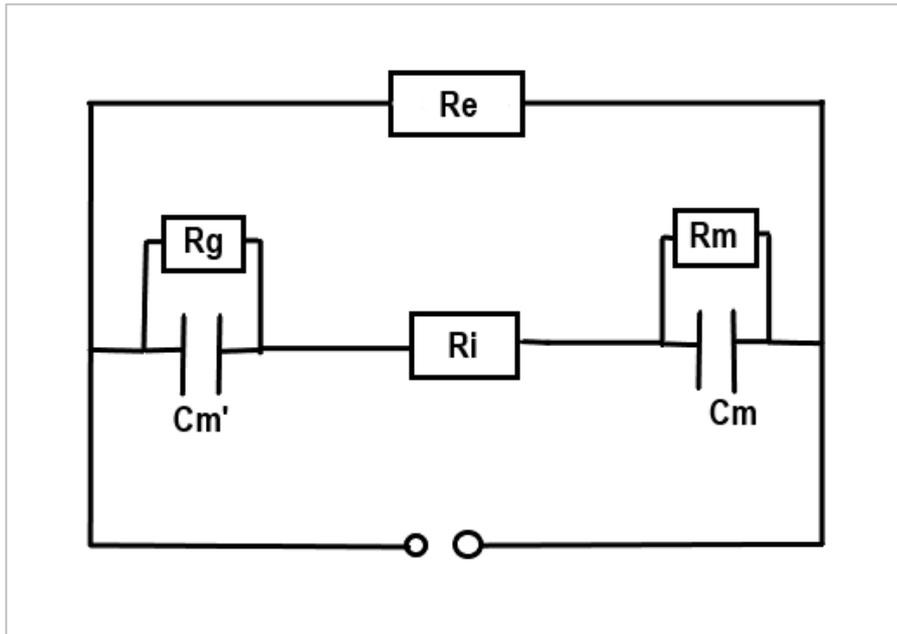
## 2.5 Impedanzmessung

Das Verfahren der Impedanzmessung erfasst das elektrische Verhalten fester und flüssiger Systeme. Als Parameter für die Veränderung der Impedanz der Leber wurden die zeitlichen Veränderungen der Dielektrizität in Abhängigkeit von Frequenz und Temperatur genutzt.

Die elektrische Bioimpedanzmessung ist als eine schnelle, nicht-invasive, gewebeschonende, leicht anwendbare und reproduzierbare Methode nutzbar, um Veränderungen in ischämischem Gewebe festzustellen (Gersing, 1999; Gersing et al., 1981; Mellert et al., 2011; Preusse et al., 1982; Preusse et al., 2003).

Die passiven elektrischen Eigenschaften von Gewebe lassen sich durch Parallel- und Reihenschaltung von kapazitiven und Ohmschen Widerständen beschreiben (Knapp et al., 2007).

Abbildung 3 zeigt ein Ersatzschaltbild zur Darstellung der elektrischen Eigenschaften von Gewebe nach Gersing 1991.



**Abb. 3:** Erweitertes Ersatzschaltbild zur Erklärung der elektrischen Impedanz von Gewebe unter Berücksichtigung der Gap Junctions. Angenommen wird ein intrazellulärer und ein parallel geschalteter extrazellulärer Leitungsweg.

$R_e$  = Extrazellulärer Widerstand       $C_m$  = Kapazität der Zellmembran

$R_m$  = Membranwiderstand                   $R_g$  = Gap Junction Widerstand

$R_i$  = Intrazellulärer Widerstand (Zytosol)

$C_m'$  = Membrankapazität der Doppelmembran zweier benachbarter Zellen

Abbildung 3 zeigt das vereinfachte Modell eines Gewebekompartiment in dem die elektrischen Eigenschaften des gesamten Gewebes beispielhaft durch den Stromkreis einer einzelnen Zelle beschrieben werden. In einem Zellkomplex mit identischen elektrischen Eigenschaften wären die benachbarten Zellen durch Gap Junctions miteinander verknüpft. Der Extrazellulärraum ist dargestellt durch den Widerstand  $R_e$ . Die Eingangs- und Ausgangsmembran der Zelle, zusammengefasst durch  $C_m$ , die elektrischen Eigenschaften des Intrazellulärraums werden als  $R_i$  bezeichnet, die Eigenschaften aller Doppelmembranen werden zu  $C_m'$  zusammengefasst und alle Gap Junction Kanäle wurden mit  $R_g$  bezeichnet (Schaefer et al., 2018).

Der Stromfluss über den komplexen transzellulären Weg passiert zunächst die äußere Zellmembran, beschrieben durch den Ohmschen Widerstand  $R_m$  für die wasserpermeablen Leitungswege und die Kapazität  $C_m$  für die Lipiddoppelschicht. Er fließt weiter durch den Widerstand  $R_i$  und durch die Gap Junctions mit dem Widerstand  $R_g$  oder über die Gap Junctions umgebene Doppelmembran mit der Kapazität  $C_m'$ . Die Stromverteilung über die beiden parallelen Leitungswege der Ersatzschaltung bzw. des Gewebes ist abhängig von der Frequenz des angelegten Wechselstroms sowie der Größe der kapazitiven und Ohmschen Widerstände.

Für Wechselstrom niedriger Frequenzen werden die kapazitiven Widerstände der Zellmembran sehr groß, der Strom fließt überwiegend über den Extrazellulärraum. Dagegen wird der kapazitive Widerstand für Wechselstrom hoher Frequenzen gegenüber den Ohmschen Widerständen minimal, der Stromfluss erfolgt überwiegend über den transzellulären Leitungsweg. Das bedeutet, dass Veränderungen der Strukturen wie etwa die Entkopplung von Gap Junctions den Wechselstromwiderstand, d.h. die komplexe elektrische Impedanz in bestimmten Frequenzbereichen verändern. Die Größe der elektrischen Impedanz wird dabei durch die Dielektrizitätszahl  $\epsilon$  und die Leitfähigkeit  $\sigma$  des Gewebes im jeweiligen Frequenzbereich des angelegten Wechselstroms bestimmt. Der Frequenzbereich des Impedanzspektrums reicht von 100 Hz bis 1 MHz.

Aus der Gleichung für die Dielektrizitätszahl  $\epsilon(\omega)$  (Gleichung 1) und der gemessenen komplexen elektrischen Impedanz  $Z(\omega)$  wurde die Dielektrizitätszahl  $\epsilon(\omega)$  und die Leitfähigkeit  $\sigma(\omega)$  errechnet.

$$\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) - i \frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega}(\omega) = \frac{1}{i \omega C_0 Z(\omega)}$$

(Gleichung 1)

Hier bezeichnet  $i$  die Imaginärzahl ( $=\sqrt{-1}$ ),  $\omega = 2\pi f$ ,  $f$  die Frequenz des angelegten Wechselstroms,  $\sigma$  die Leitfähigkeit,  $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ As/Vm}$  und  $C_0$  die Kapazität der Elektroden, die aus den Kalibrierungsdaten ermittelt wurde. Damit ergibt sich das dielektrische Spektrum als Veränderung der Dielektrizitätszahl  $\epsilon'$  in Abhängigkeit von der Frequenz des angelegten Wechselstroms (Knapp, 2007)

$$Z(f) = \frac{Re(f)}{1 + i \omega C m Re(f)}$$

Z= elektrische Impedanz

f = Frequenz

Impedanzmessungen werden unter anderem genutzt, um Rückschlüsse auf das extrazelluläre Volumen ziehen zu können (Gersing, 1991; Mellert et al., 2011). Wir bestimmen den Extrazellulärindex (EZRI) über die Berechnung des Verhältnisses der Leitfähigkeit *sigma* ( $\sigma$ ) der kleinsten verfügbaren Frequenz zur größten verfügbaren Frequenz.

$$EZRI = \frac{Z(0)}{Z(\infty)}$$

Z= elektrische Impedanz

$\sigma$ = gemessene Leitfähigkeit

Bezogen auf unsere Messungen galt

$$EZRI = \frac{\sigma(220HZ)}{\sigma(1MHZ)}$$

In der Literatur wird der Extrazellulärraum als bestimmende Größe für die niederfrequenten Impedanz und ihre Veränderungen während Ischämie bezeichnet (Korf und Postema, 1988). Untersuchungen von Kehrer et al. (1990) zweifeln an dieser Auffassung, weil ein zusätzlicher Einfluss der Gap Junctions vermutet wird.

### 3 Ergebnisse

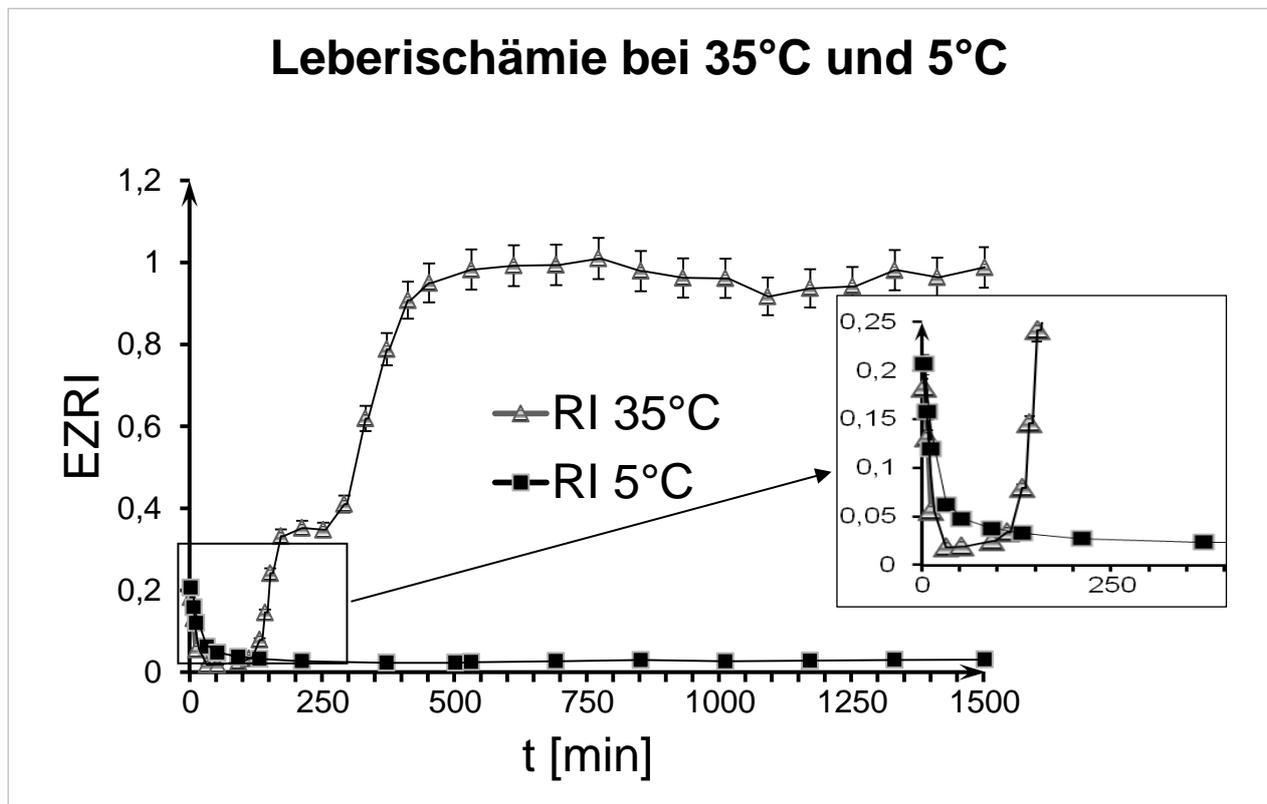
Versuche an Rattenlebern (n = 43) während Ischämie unter verschiedenen Protektionsbedingungen.

*Ausgewertete Parameter der Leberimpedanzspektren*

- EZRI aus den Impedanzdaten bei 220 Hz, 13 kHz 112 kHz, 1 MHz,
- Dielektrizitätszahl bei 220 Hz, 13 kHz, 112 kHz und 1 MHz
- Leitfähigkeit bei 13 kHz und 1 MHz.

#### 3.1 Reine Ischämie bei 35 °C (n=2) im Vergleich zu 5 °C (n=3)

EZRI



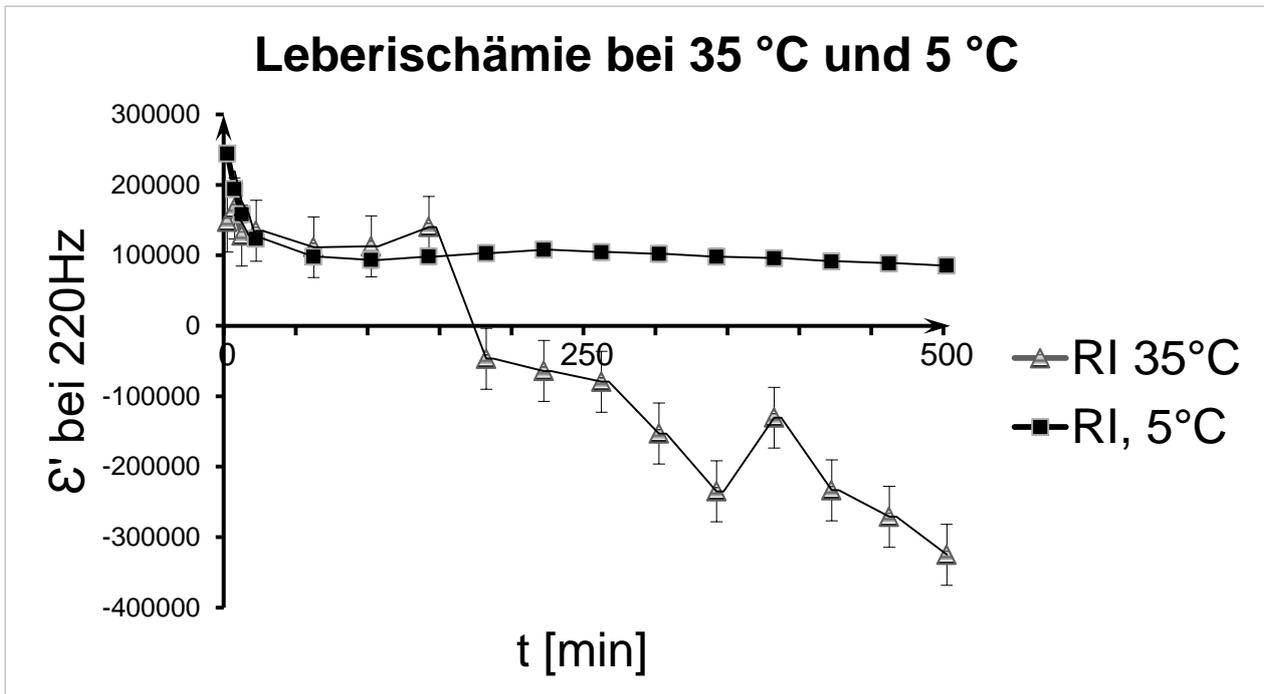
**Abb. 4:** Vergleich des EZRI während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 24 h.

In Abbildung 4 bei 35 °C sehen wir zu Beginn der reinen Ischämie einen steilen Abfall des EZRI - gleichbedeutend einer Zunahme des Gewebe-Ödems - bis zur 12. Minute mit einer folgenden leicht ansteigenden Plateauphase, bis ab der 115. Minute der Steilanstieg des EZRI erfolgt.

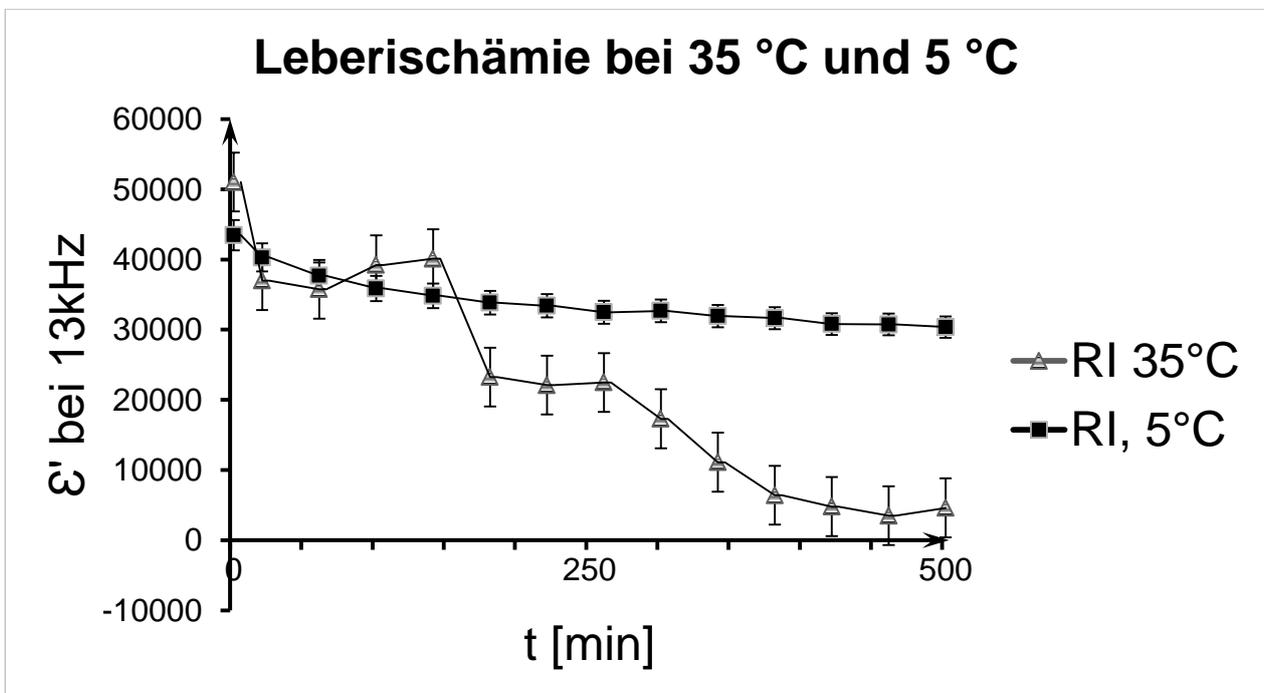
Der unmittelbare - zu Beginn der Ischämie erkennbare - Steilabfall des EZRI deutet an, dass das intrazelluläre Ödem ansteigt mit der resultierenden Abnahme des Extrazellulärraums.

Bis zur ca. 500. Minute nähert sich der EZRI sigmoidal dem nächsten Plateau bei einem Wert von 1,0 an. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Extrazellulärraum dem Gesamtvolumen entspricht. Dieser Zustand tritt im Gewebe dann auf, wenn sich die Zellmembranen aufgelöst haben und der Zelltod eingetreten ist (*Abb. 4*). Die kurze erkennbare Plateauphase von der 180. bis zu 270. Minute ist zurzeit noch nicht wissenschaftlich erklärbar.

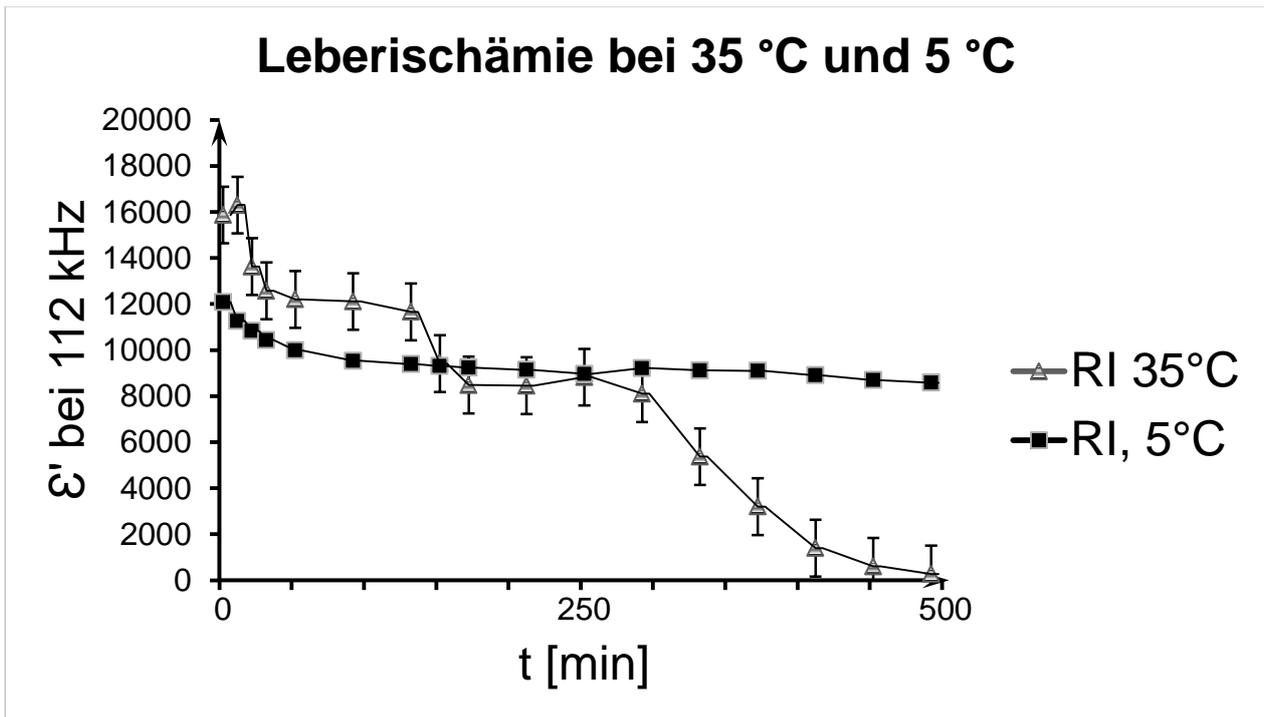
Bei 5 °C - reiner - Ischämie (*Abb. 4*) erfolgt ein langsamerer Abfall des EZRI, nähert sich aber schnell einer Plateauphase jedoch in diesem Fall auf niedrigem Niveau und bleibt über den Beobachtungszeitraum konstant.

Dielektrizitätszahl  $\epsilon$ 

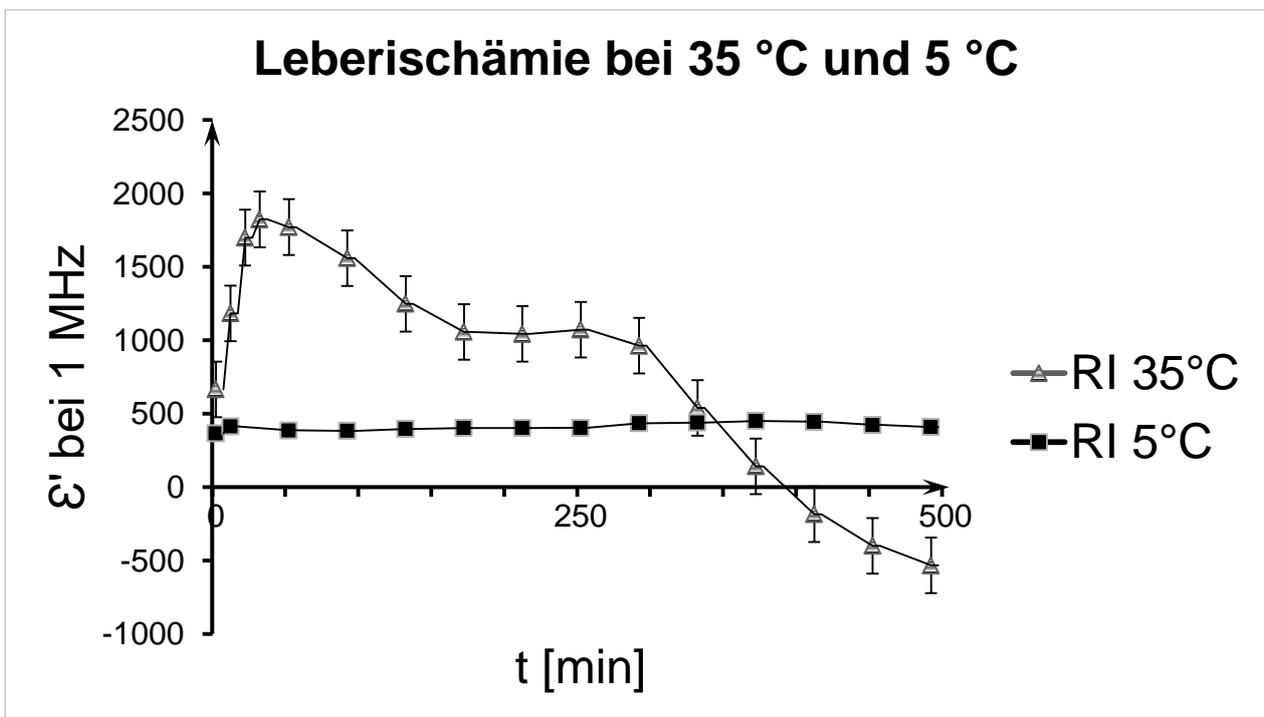
**Abb. 5:** Vergleich der DZ bei 220 Hz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 5 h.



**Abb. 6:** Vergleich der DZ bei 13 kHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h.



**Abb. 7:** Vergleich der DZ bei 112 kHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h

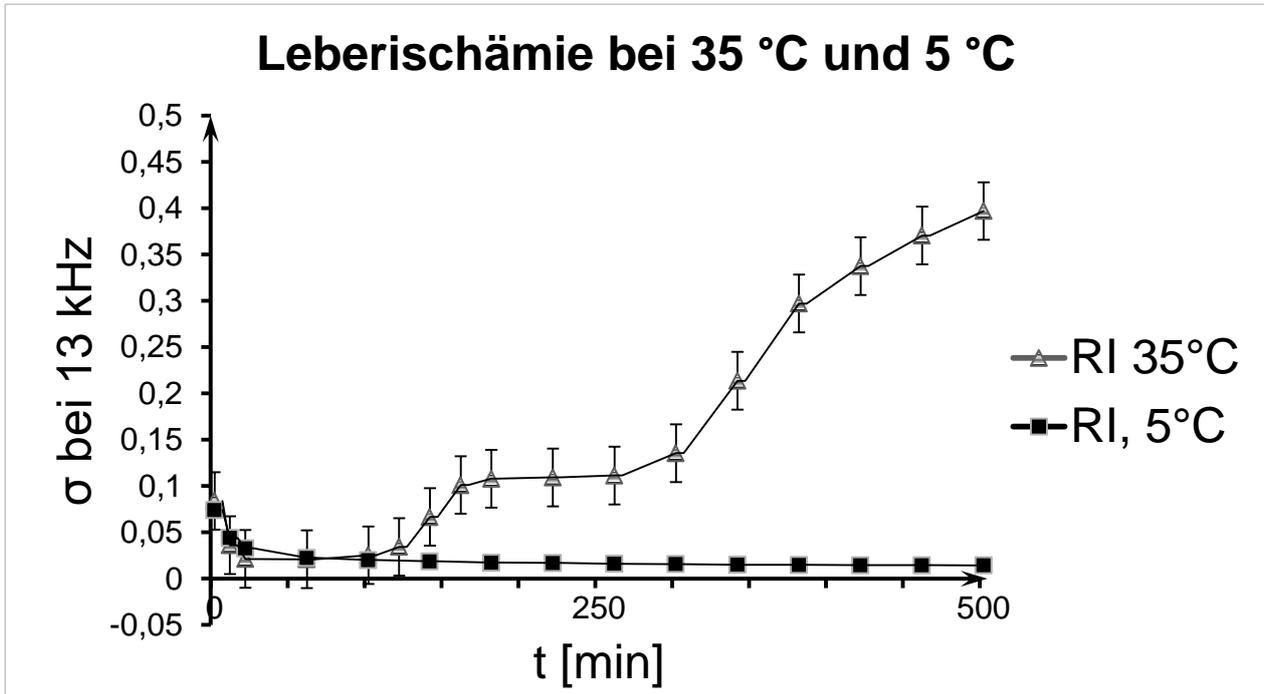


**Abb. 8:** Vergleich der DZ bei 1 MHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h.

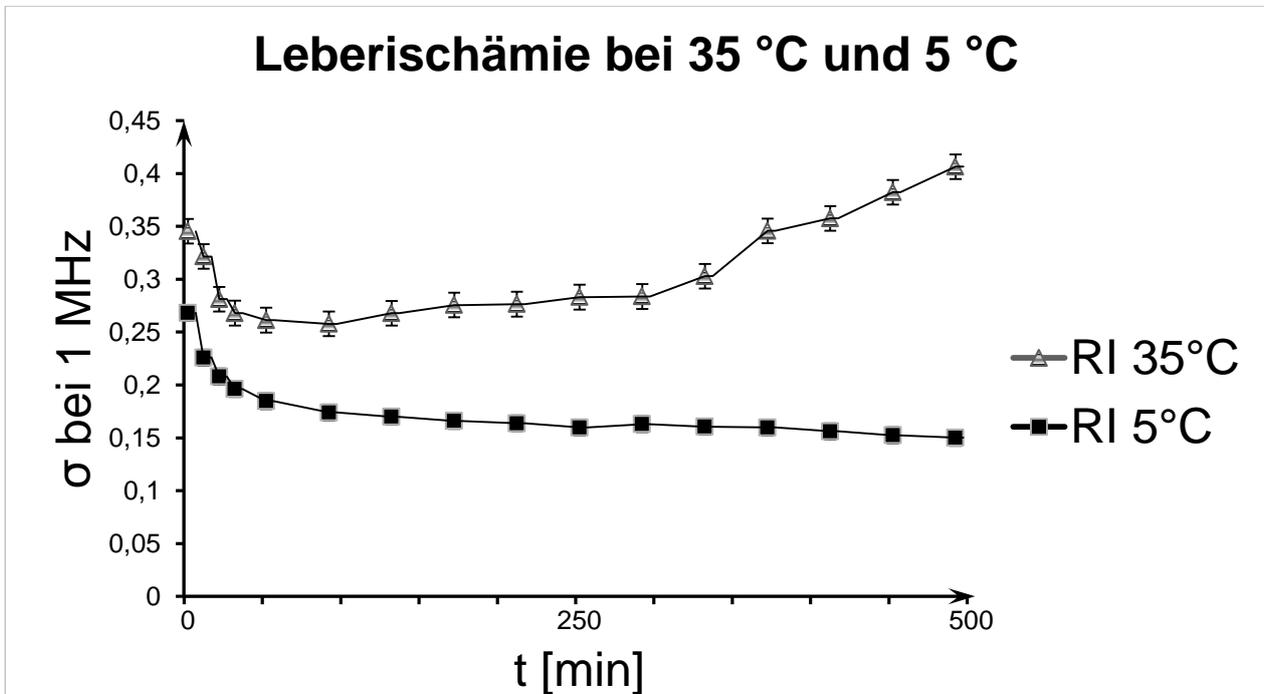
Abbildung 5-8 stellen die Messungen der Dielektrizitätszahl (Dz) bei unterschiedlichen Frequenzen und den beiden Temperaturen von 5 °C und 35 °C dar. Die Dielektrizitätszahl (Dz)  $\epsilon'$  ist das Maß für die Permittivität des Gewebes bei verschiedenen Frequenzen. Bei  $\epsilon'$  im Frequenzbereich von 220 Hz bis 112 kHz fällt die DZ bei 5 °C kontinuierlich ab, bei 220 Hz tritt ein stärkerer Abfall bis zur 10. Minute ein. Bei hohen Frequenzen (Abb. 8) gibt es einen vernachlässigbaren initialen Anstieg bis zur 10. Minute, der in eine Plateauphase mündet.

Der Ausgangswert der DZ zu Beginn der Ischämie ist bei 220 Hz (Abb. 5) erheblich höher, nimmt entsprechend der Frequenz-Steigerung der DZ bis 1 MHz (Abb. 8) kontinuierlich ab. Bei den Versuchen bei 35 °C fällt die DZ im niedrigfrequenten Bereich von 220 Hz und 13 kHz in den ersten 15 Minuten ab. Im Vergleich dazu steigt die DZ bei hohen Frequenzen (112 kHz, 1 MHz) an, wobei der Anstieg proportional zur Frequenzhöhe steiler wird. Der erneute Anstieg nach ca. 100 Minuten kann als eine Kapazitätsveränderung aufgrund einer strukturellen Membranveränderung interpretiert werden.

Im weiteren Verlauf ab der 150. Minute sieht man bei 35 °C einen starken Abfall der DZ über den ganzen Frequenzbereich. Da zu diesem Zeitpunkt die Leitfähigkeit und der EZRI steigen, kann vermutet werden, dass ab der 150. Minute der Ischämie ein Membranzerfall abläuft.

Leitfähigkeit  $\sigma$ 

**Abb. 9:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 13 kHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h.



**Abb. 10:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 1 MHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 5 h.

Bei Betrachtung der Leitfähigkeitsänderung der Ischämischen Leber bei 35 °C und 5 °C wird bei 13 kHz (*Abb. 9*) in den ersten 10 min ein deutlicher Abfall von  $\sigma$  sichtbar. Der Abfall bei 35 °C ist initial erwartungsgemäß deutlich steiler. Im weiteren Verlauf der 35 °C -Versuche entwickelt sich eine Plateauphase, die nach etwa 100 Minuten beendet wird. Anschließend steigt  $\sigma$  wieder deutlich an.

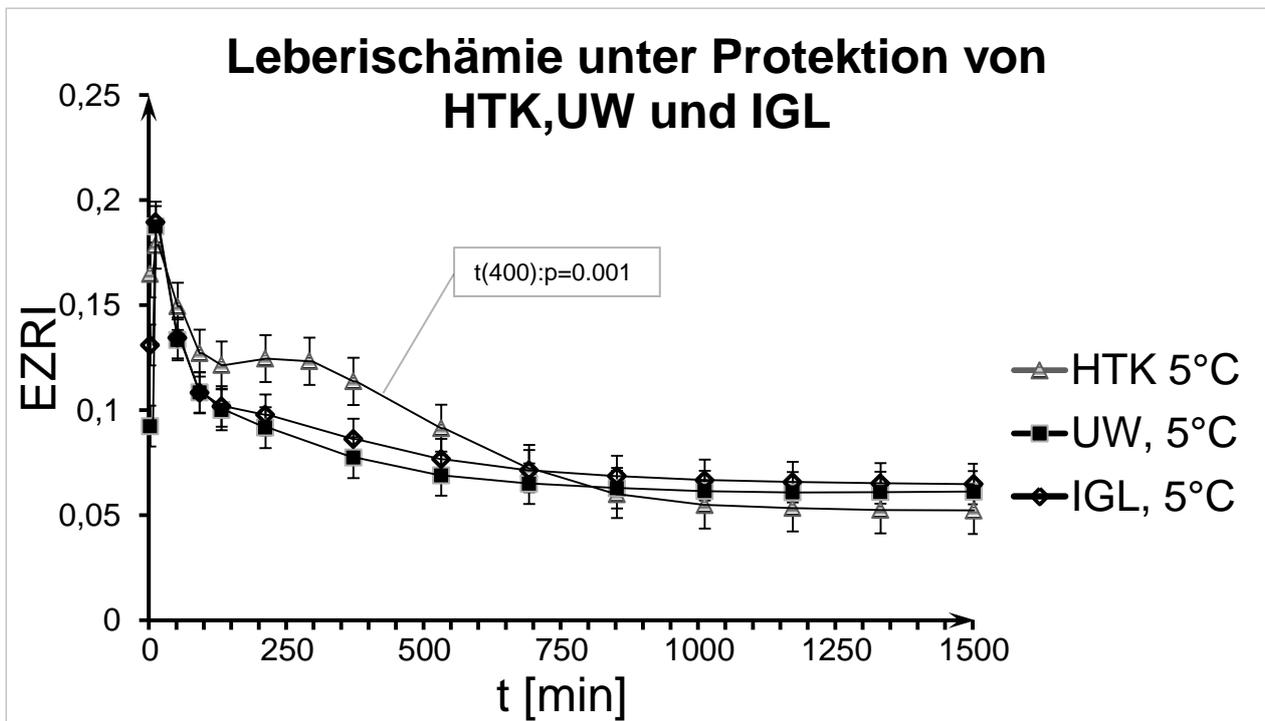
Die Messungen von  $\sigma$  bei 5 °C münden nach einem initialen Abfall in einer Plateauphase der Leitfähigkeit. Bei 1 MHz ist ein ähnlicher Kurvenverlauf zu betrachten. Auch hier kommt es sowohl bei 5 °C, als auch bei 35 °C zu einem initialen Abfall, der in beiden Kollektiven etwa bis zur ca. 30. Minute dauert. Im 35 °C Kollektiv ändern sich die Messwerte gering, bis nach 5 Stunden die Werte deutlich ansteigen (*Abb. 10*). Im 5 °C Kollektiv fällt die Leitfähigkeit anfänglich deutlich ab und setzt in eine Plateauphase über.

Erwartungsgemäß werden bei niedrigeren Frequenzen auch im Kurvenverlauf niedrigere Werte für die Leitfähigkeit  $\sigma$  gemessen, im Vergleich zu höheren Frequenzen, wie die *Abb. 10* zeigt.

### **3.2 Leberischämie bei 5 °C unter verschiedenen Protektionsbedingungen**

Im Folgenden wird die HTK- Lösung nach Bretschneider (n=13) mit der IGL- Lösung (n=7) und der UW- Lösung (n=7) bei 5 °C verglichen. (vgl. auch *Tab.1*)

## EZRI



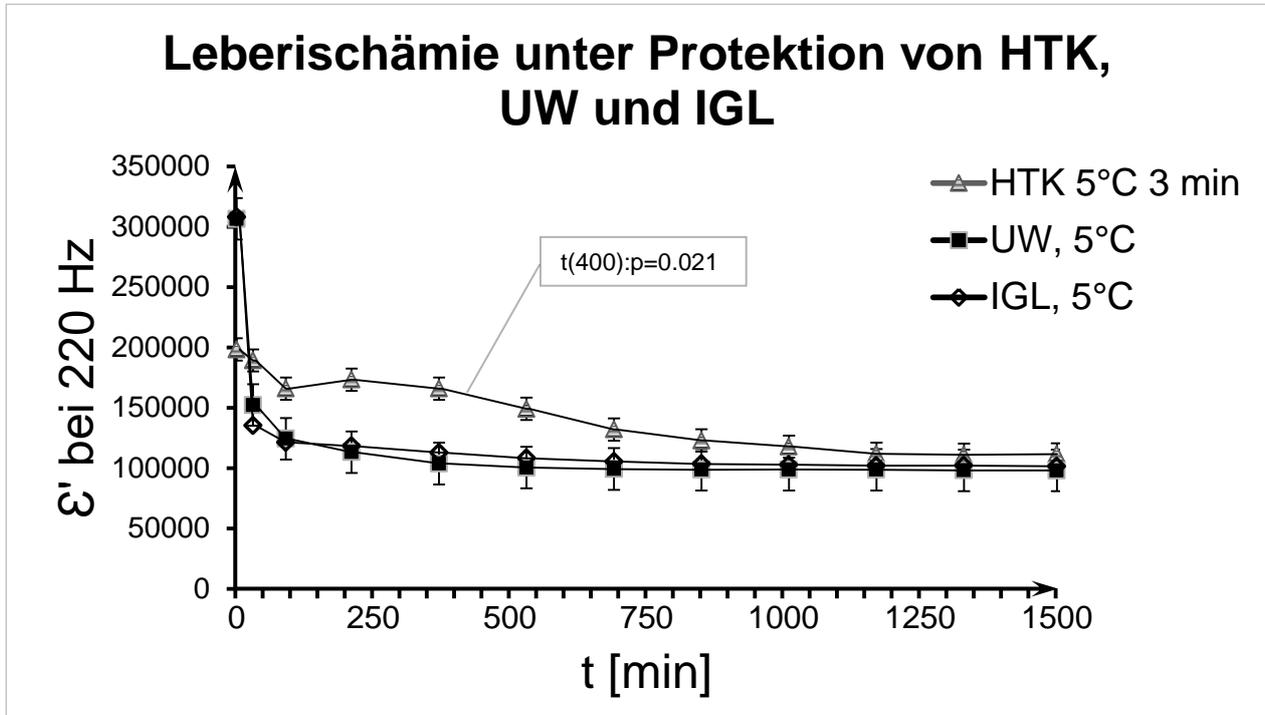
**Abb. 11:** Vergleich des EZRI von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

Der EZRI fällt unabhängig von dem Protektionsverfahren initial ab, so wie es als Folge eines sich entwickelnden Zellödems zu erwarten ist (Abb. 11). Sowohl bei IGL und UW fällt der EZRI in den ersten 60 Minuten rapide ab und geht anschließend in ein Plateau über. Bei der HTK- Lösung fällt der initiale Abfall deutlich geringer aus und ändert sich nicht zwischen der 100. und 300. Minute. Diese Phase in der sich das Zellödem nicht ändert, unterscheidet sich deutlich von der IGL und UW Gruppe und liegt auf einem deutlich höheren Niveau. Ein im Vergleich zur reinen Ischämie deutlicher Anstieg des EZRI (Abb. 4) ist nach Anwendung sämtlicher Protektionslösungen nicht zu beobachten.

Eine Signifikanz ließ sich hier zwischen den Kollektiven (HTK, UW, IGL) und reiner Ischämie bei 5°C (in Abb. 4) nachweisen ( $t(400);p=0.001$ ).

Dielektrizitätszahl  $\epsilon'$ 

220 Hz

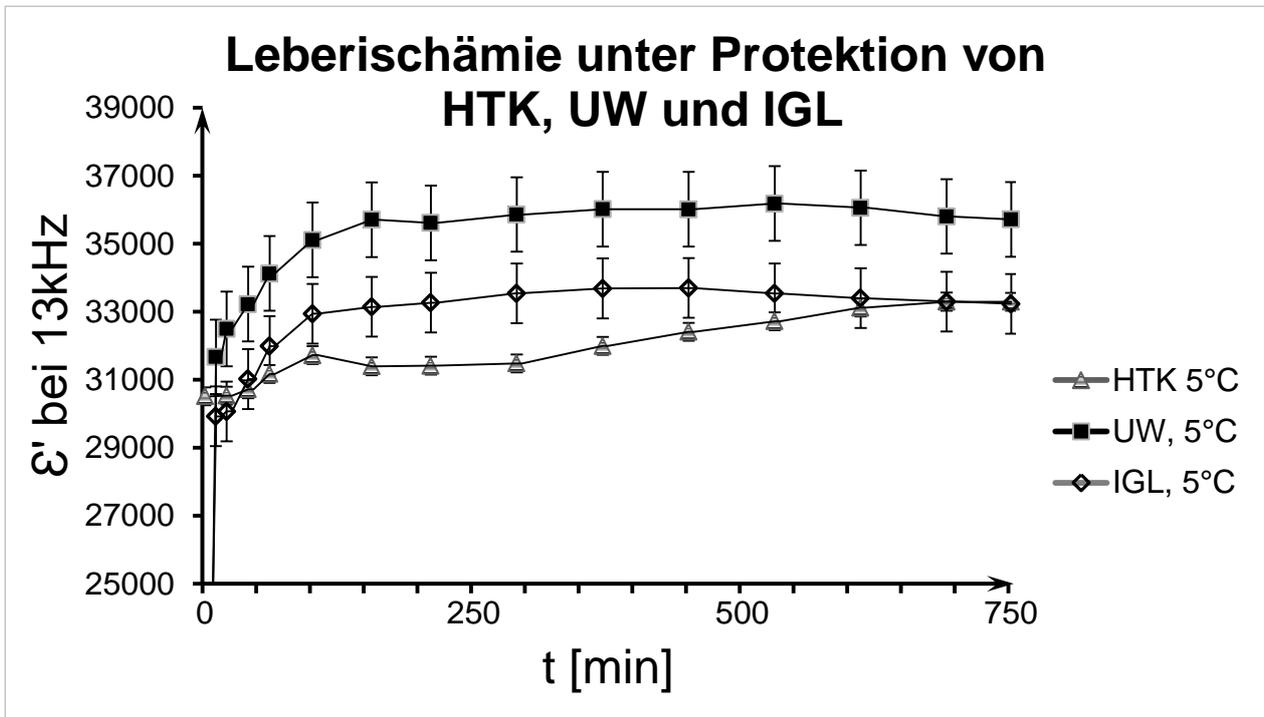


**Abb. 12:** Vergleich der Dielektrizitätszahl bei 220 Hz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

Bei niedriger Frequenz (220 Hz) zeigt die DZ in allen Kollektiven innerhalb der ersten 10 Minuten einen drastischen Abfall. Sowohl bei IGL und UW (Abb. 12) wurde der Abfall auf einen Wert von 140.000 (IGL) und 170.000 (UW) gemessen mit sich anschließenden nahezu konstanten Werten von 100.000.

Auffällig unterscheidet sich davon der Abfall der DZ bei HTK. Weder ist der initiale Abfall so steil, noch fällt die DZ insgesamt so stark ab. Nach 10 Minuten liegt die DZ bei HTK bei ca. 200.000, nach 100 Minuten bei 160.000 und bleibt etwa auf diesem Niveau bis zur ca. 400. Minute nahezu konstant. Die gemessenen Werte bei HTK unterscheiden sich hier signifikant ( $t(400):p=0.021$ ). Erst nach 1000 Minuten haben alle Protektionsverfahren ein ähnliches Niveau.

13 kHz

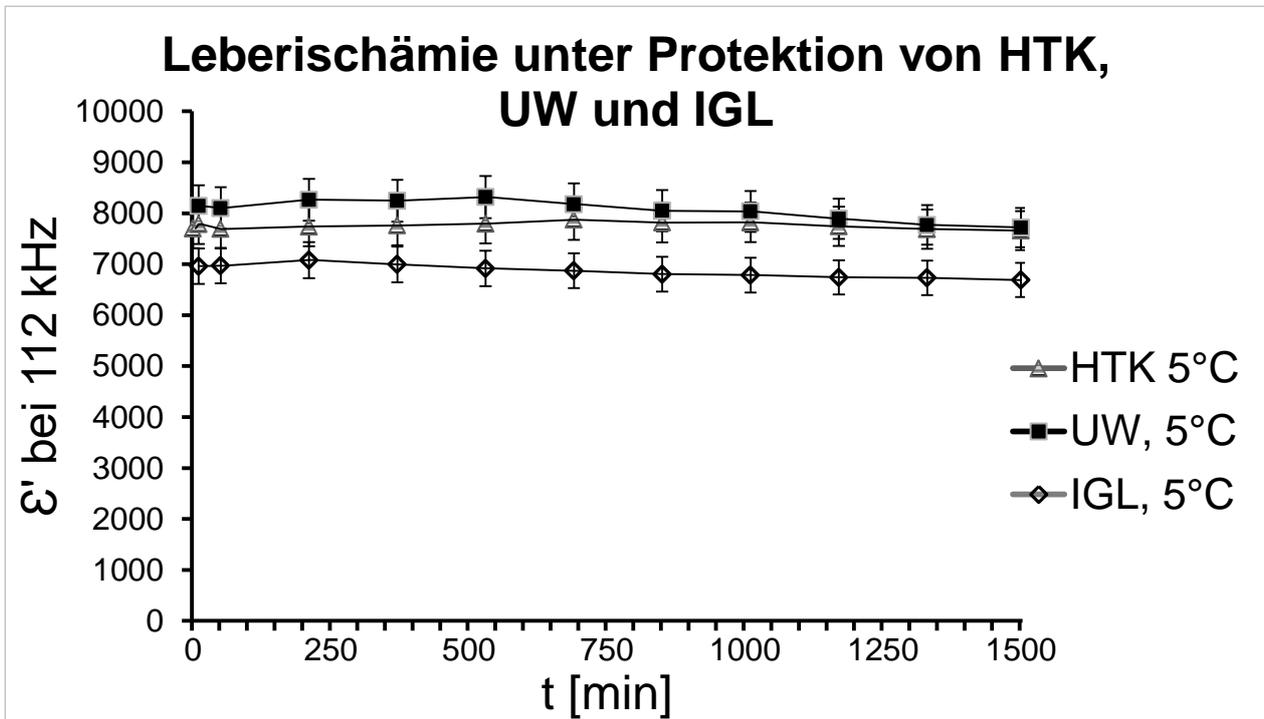


**Abb. 13:** Vergleich der DZ bei 13 kHz von HTK, UW und IGL bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 12,5 h.

Bei Analyse der DZ- Verläufe bei 13 kHz sieht man grundsätzlich einen sigmoidalen Anstieg der DZ unabhängig von den Protektionslösungen als möglichen Hinweis auf Gap Junction Verschlüsse (Lueck et al., 2016).

Unter UW und IGL gehen die DZ-Werte früher als bei HTK in ein Plateau über. Unter UW tritt das Plateau bei etwa 150 Minuten, unter IGL bei etwa 100 Minuten und unter HTK erst nach ca. 200 Minuten auf (Abb. 13).

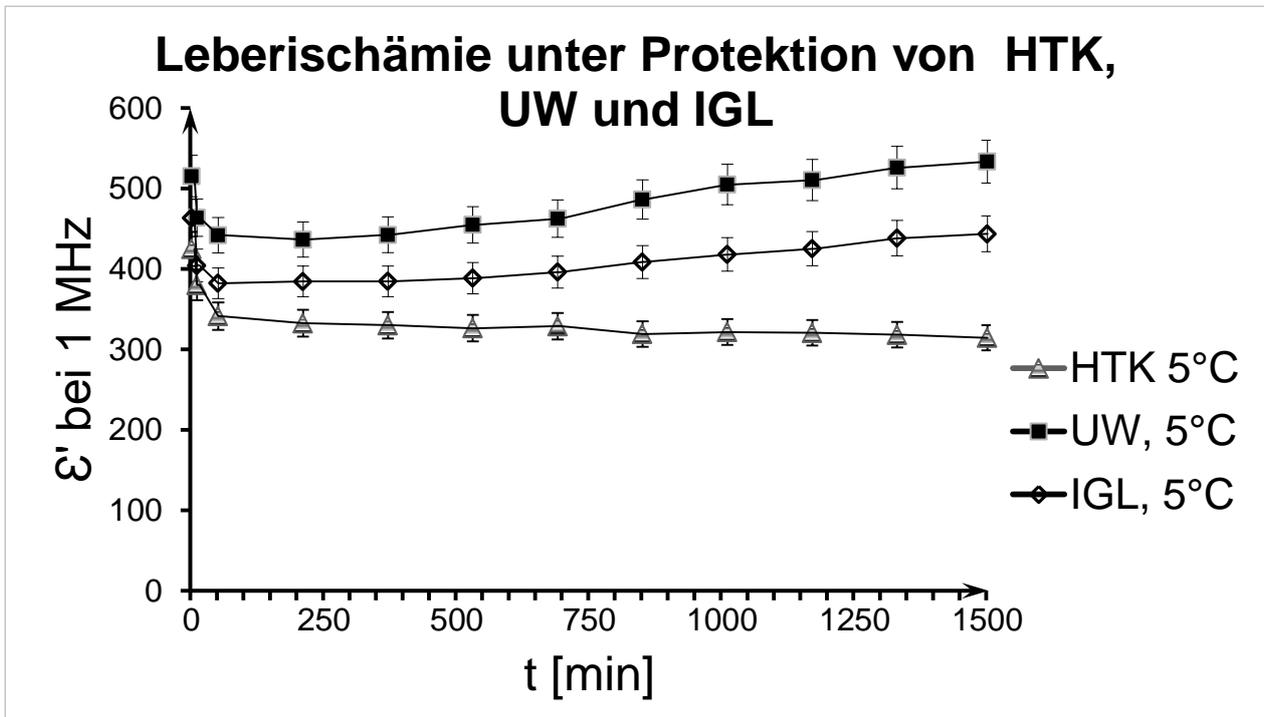
112 kHz



**Abb. 14:** Vergleich der DZ bei 112 kHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

In dem Kollektiv der DZ bei 112 kHz (*Abb. 14*) lassen sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den Protektionslösungen aufzeigen. In allen drei Kollektiven wird das Plateau nach etwa 80 Minuten erreicht. Das IGL- Kollektiv, unterscheidet sich von den beiden anderen Kollektiven lediglich dadurch, dass die DZ - Werte deutlich niedriger liegen.

1 MHz

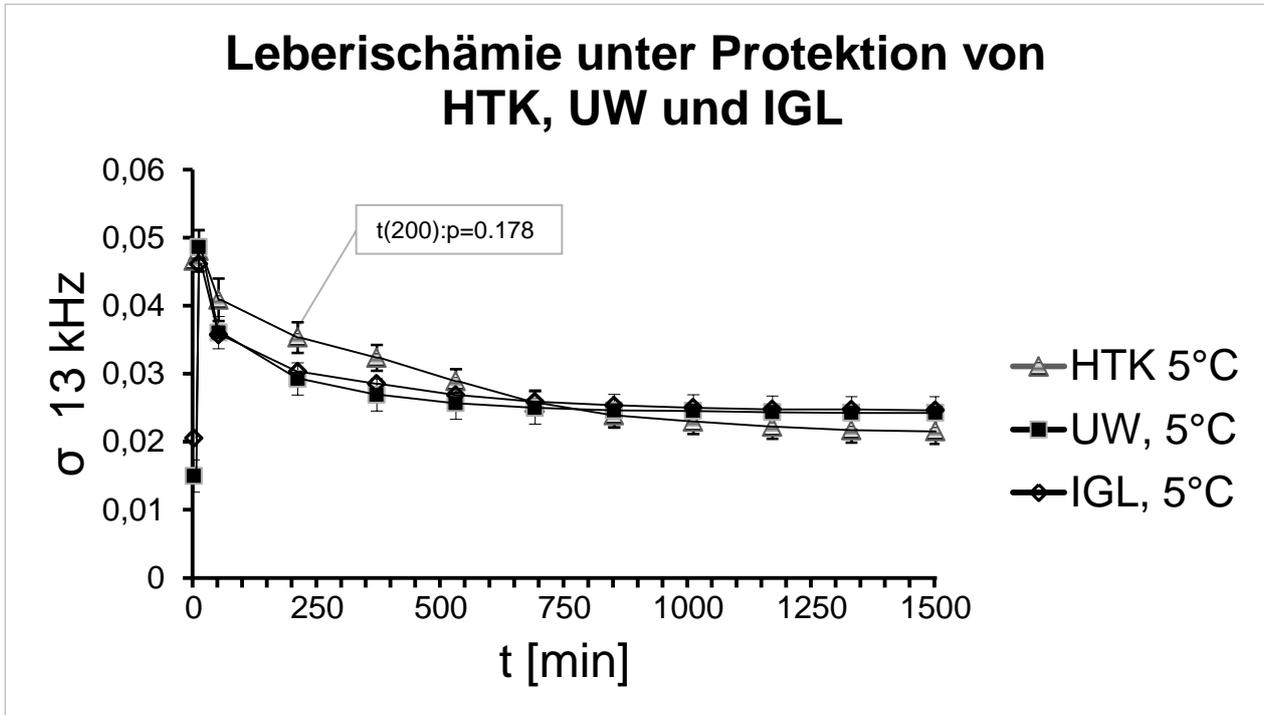


**Abb. 15:** Vergleich der DZ bei 1 MHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

Im hohen Frequenzbereich (1 MHz) zeigt sich bei allen drei Protektionslösungen zunächst ein Steilabfall der DZ, der anschließend in eine Plateauphase übergeht (Abb. 15). Die niedrigsten Werte werden für IGL nach 35 Minuten, für UW nach 40 Minuten und für HTK nach 55 Minuten erreicht. Die Werte für das HTK-Kollektiv liegen deutlich niedriger als die der IGL- und UW-Kollektive. Die DZ-Werte liegen unter HTK-Protektion bei 350, die von IGL und UW bei 450 (Abb. 15).

Leitfähigkeit  $\sigma$ 

13 kHz

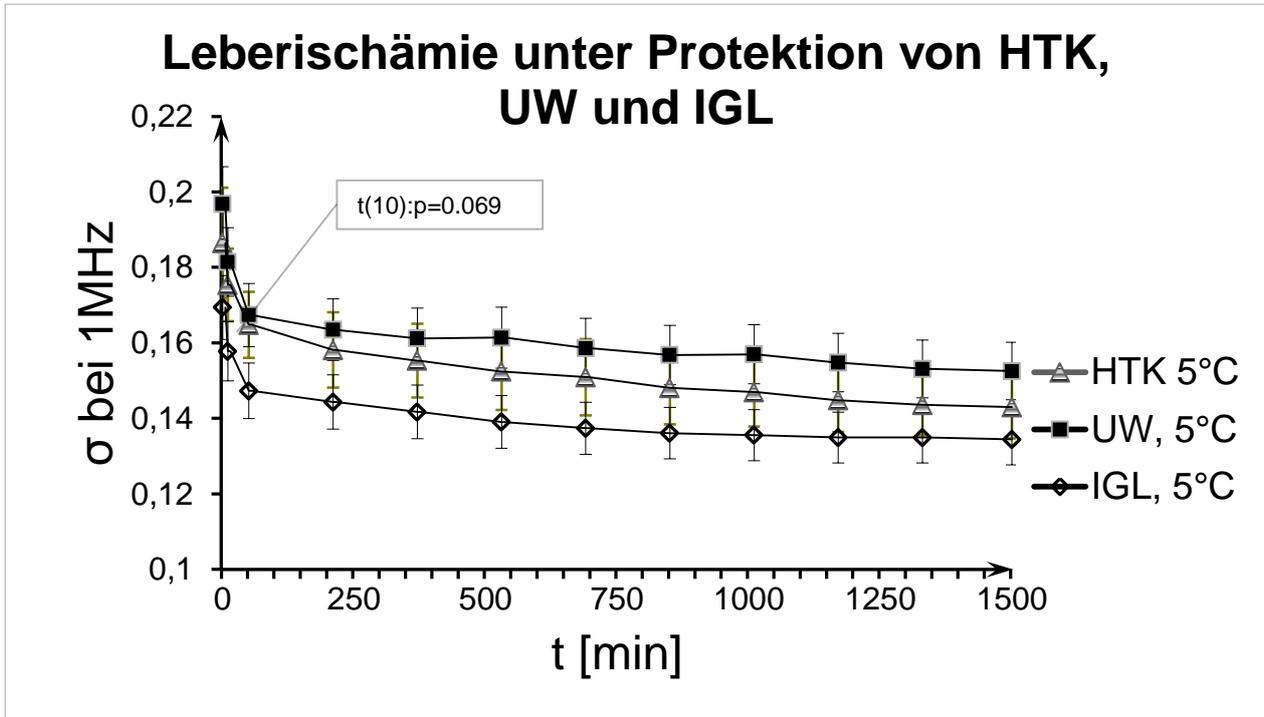


**Abb. 16:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 13 kHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

Bei der Untersuchung der Leitfähigkeit  $\sigma$  der Protektionslösungen (Abb. 16) kommt es zu einem steilen Abfall von  $\sigma$ , der ab der 60. Minute flacher wird und nach längerer Ischämiezeit in eine Plateauphase übergeht.

Die drei Protektionsverfahren unterscheiden sich hierbei nicht wesentlich ( $t(200):p=0,178$ ), was darauf hinweist, dass alle untersuchten Lösungen einen protektierenden Effekt aufweisen. Nach Anwendung der HTK- Lösung ändert sich die Leitfähigkeit wie in den beiden anderen Kollektiven, jedoch ist der Abfall von  $\sigma$  auffällig langsamer.

1 MHz

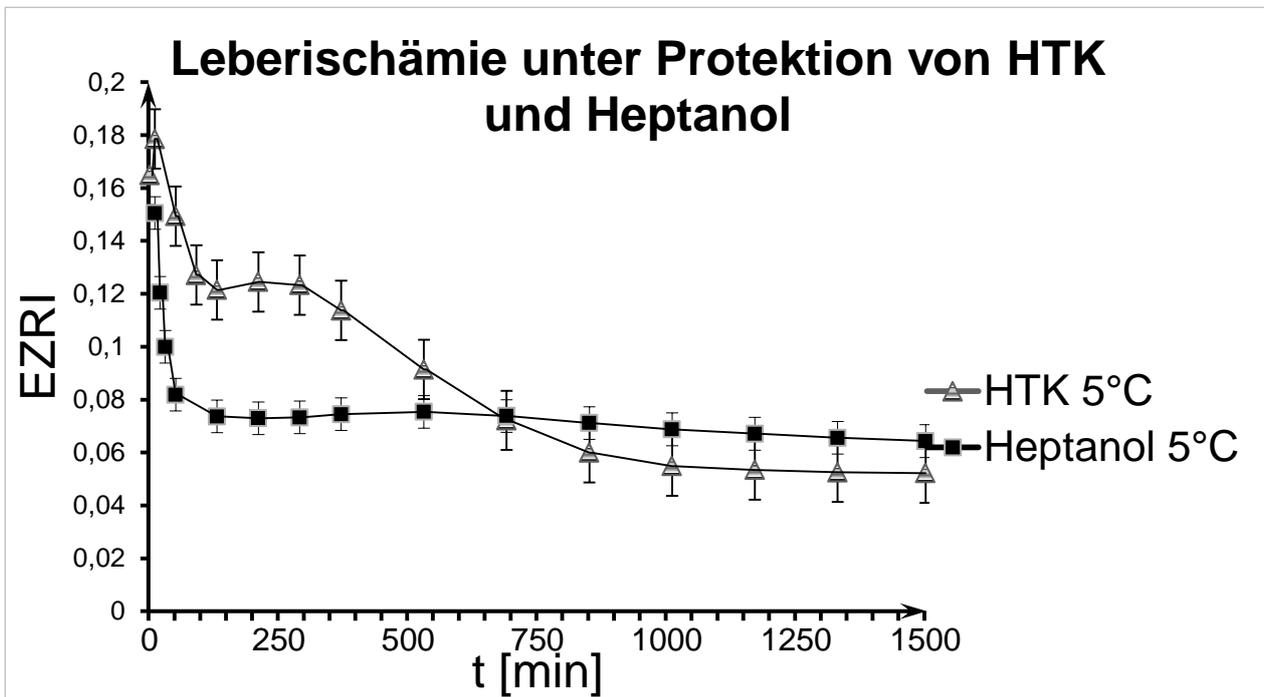


**Abb. 17:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 1 MHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

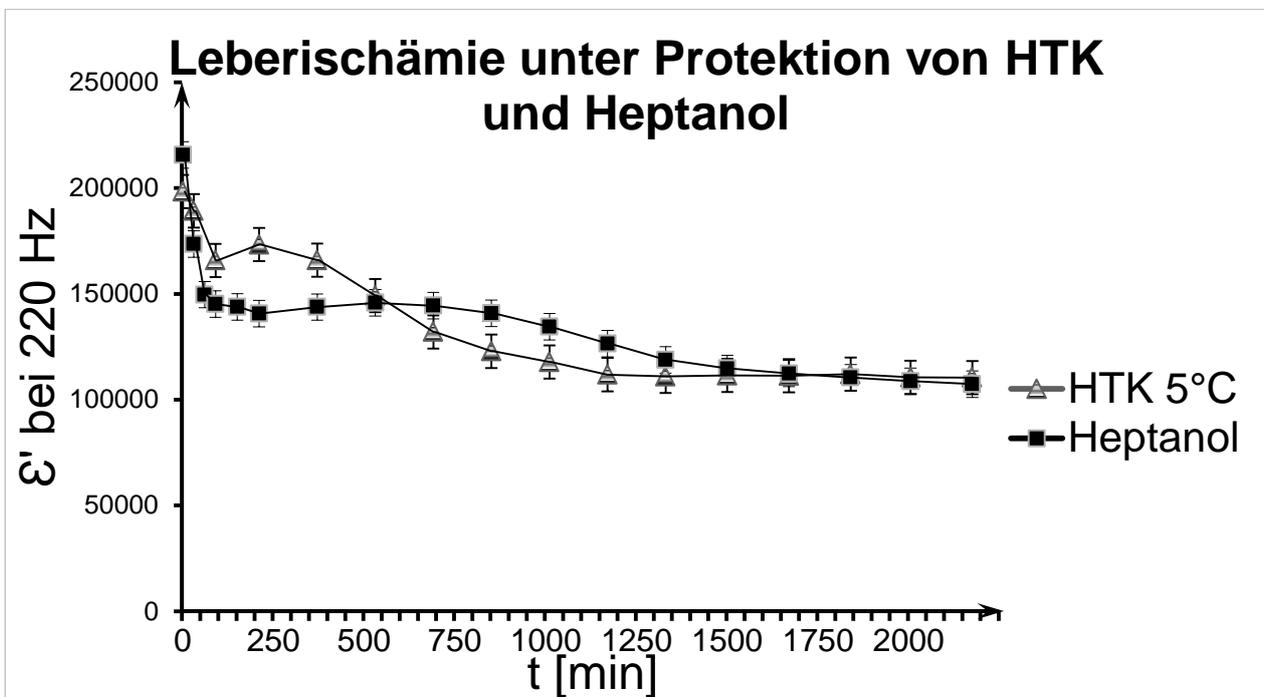
Entsprechend dem Kurvenverlauf bei 13 kHz können wir auch bei 1 MHz einen initial steilen Abfall von  $\sigma$  beobachten, der ab der 30. Minute in einen flacheren Verlauf übergeht und im weiteren Verlauf der Ischämie nur noch leicht abfällt (Abb. 17). Bei Betrachtung der unterschiedlichen Protektionsverfahren unterscheiden sich HTK und UW deutlich von IGL, wobei bei  $\sigma$  unter HTK und UW von einem höheren Niveau startet und nicht so stark abfällt. UW und HTK verlaufen nahezu parallel und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $t(10):p=0.069$ ).

Der frühzeitige Übergang in die Plateauphase kann auf die Gap Junction Verschlüsse hinweisen. Unter Annahme der Hypothese, dass bei hohen Frequenzen der Strom sowohl intra- als auch extrazellulär fließt, können die Leitfähigkeitsveränderungen unter HTK und UW als Hinweis auf eine bessere Protektionseffizienz interpretiert werden.

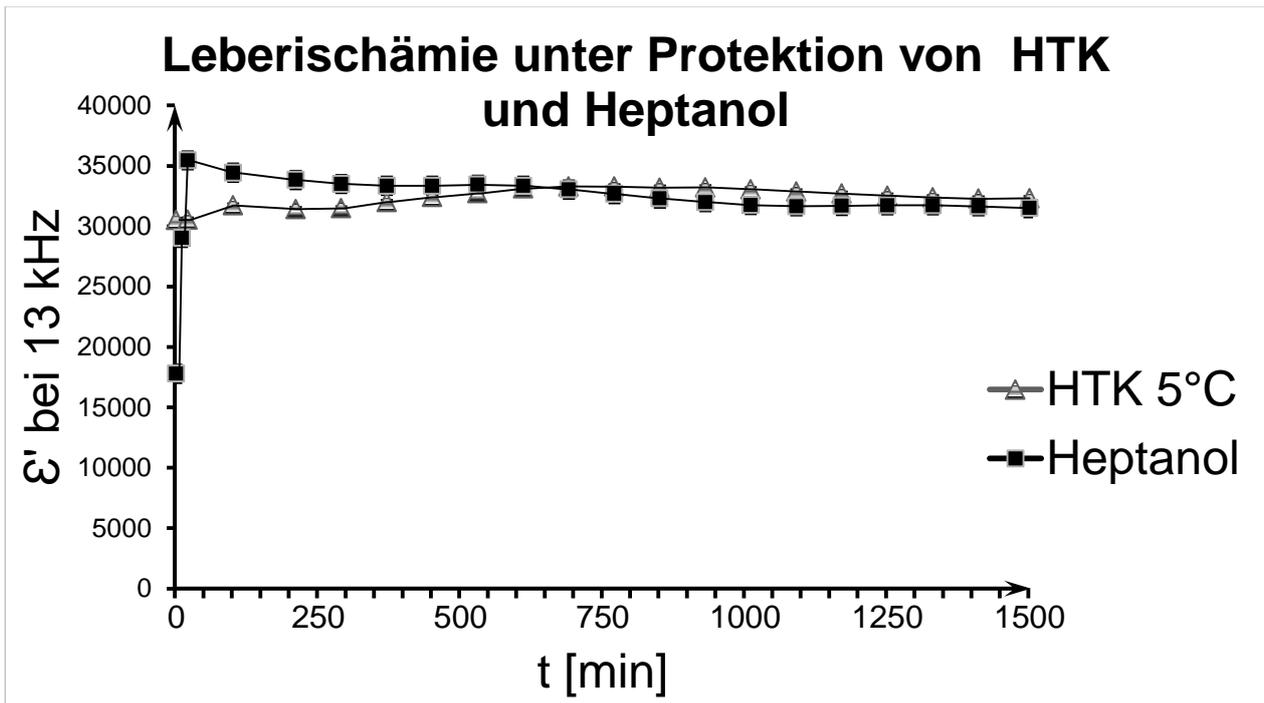
### 3.3 HTK (n=13) im Vergleich mit Heptanol (n=2) während Ischämie bei 5 °C



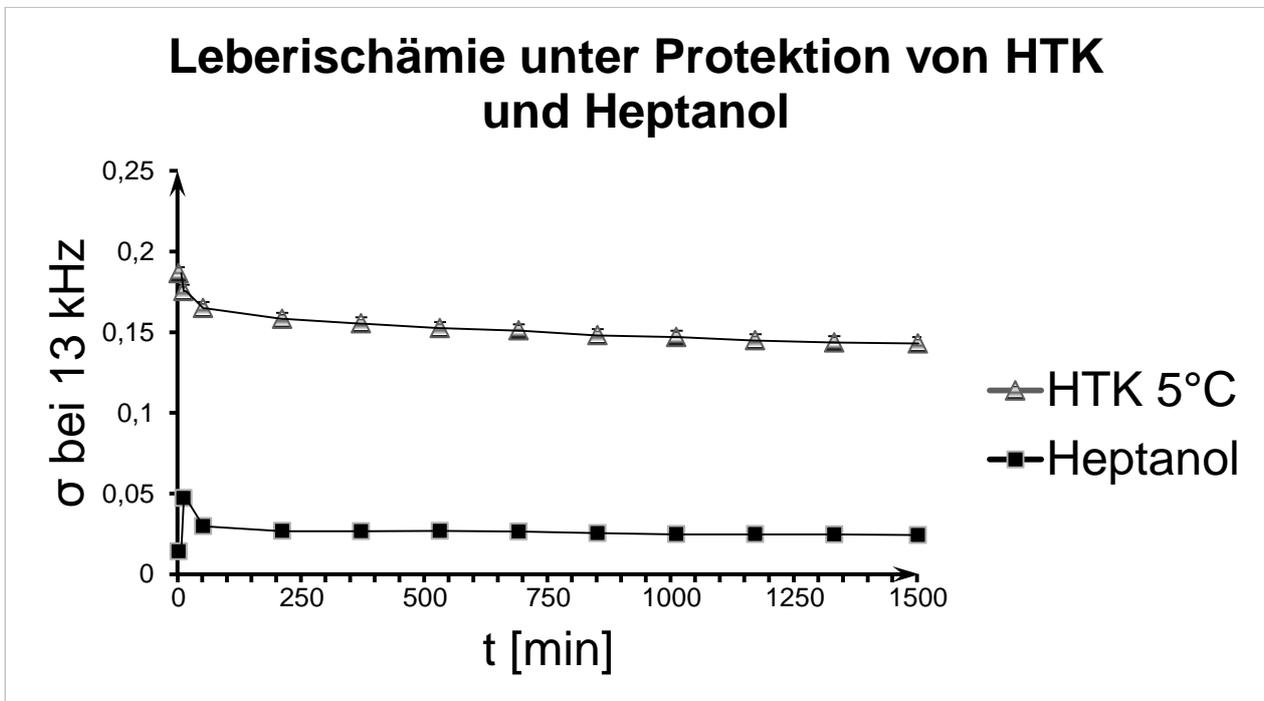
**Abb. 18:** Vergleich des EZRI bei HTK bei 5 °C und Heptanol während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.



**Abb. 19:** Vergleich der DZ bei 220 Hz bei HTK bei 5 °C und Heptanol während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.



**Abb. 20:** Vergleich der DZ bei 13 kHz bei HTK und HTK+ Heptanol bei 5 °C während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.



**Abb. 21:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 13 kHz bei HTK und HTK+ Heptanol bei 5 °C während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h.

Um die Validität der Impedanzmessung zu überprüfen, führten wir Versuche mit Heptanol durch. Die Wirkung von Heptanol führt zu einer vollständigen zellulären Entkopplung, wenn Heptanol einer Protektionlösung zugesetzt wird. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem sofortigen Verschluss der Gap Junctions (Rudisuli und Weingart, 1989). Der Verschluss der Gap Junctions wird in den Abbildungen 18-21 deutlich im Vergleich zu dem reinen HTK-Kollektiv.

Für die Parameter EZRI, DZ 220 Hz, DZ 13 kHz und Leitfähigkeit 13 kHz werden die Mittelwerte für das HTK+Heptanol-Kollektiv im Vergleich zu den Werten unter HTK gezeigt. Den deutlichsten Effekt von Heptanol sieht man beim EZRI. Bei Anwendung von HTK+ Heptanol ist der EZRI bereits nach 15 Minuten komplett abgefallen, während sich nach alleiniger HTK- Perfusion der EZRI erst nach etwa 12 Stunden im unteren Plateau befinden.

Bei Hinzugabe von Heptanol fällt bei DZ 220 Hz der Kurvenverlauf in den ersten 5 Minuten stark ab. Die DZ-Zahl steigt dagegen an. Die Unterschiede der beiden Kollektive - HTK und HTK-Heptanol - können auf den Gap Junction Verschluss zurückgeführt werden, da Heptanol einen Gap Junction- Verschluss nach sich zieht.

Unter HTK ist bei niedriger Frequenz (220 Hz) ein verlangsamter sigmoidaler Abfall und bei hoher Frequenz (13 kHz) ein prolongierter sigmoidaler Anstieg der DZ zu verzeichnen. Unter Heptanol fällt  $\sigma$  bei 13 kHz initial stark ab, während im HTK Kollektiv ein langsamer sigmoidaler Abfall erkennbar ist.

## 4 Diskussion

In umfangreichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass mit der elektrischen Impedanz Veränderungen der passiven elektrischen Eigenschaften von Organen während einer Ischämie reproduzierbar gemessen werden können (Erhard et al., 1993; Gersing et al., 1981; Gheorghiu und Gersing, 2002; Ivorra et al., 2005; Lueck et al., 2016; Preusse et al., 2003). Wir nutzten in dieser Arbeit diese valide Messmethode, um damit die Effizienz unterschiedlicher Protektionsverfahren an der ischämischen Rattenleber zu untersuchen.

Die Zellen mit der sie umgebenden Membran haben die Eigenschaften eines Dielektrikums wie er zwischen Kondensatorplatten vorkommt. Bei niedrigen Frequenzen üben die Membranstrukturen und der Intrazellularraum eine isolierende Funktion aus, was einen vorwiegend extrazellulären Stromfluss induziert, sodass bei niedrigen Frequenzen die elektrische Impedanz nur eine geringe Rolle spielt. Aus diesem Grund sprechen wir von dem Ohmschen Widerstand. Für hochfrequente Ströme stellen Zellmembran und Intrazellularraum kein Hindernis dar, wodurch die Impedanz wesentlich stärker beeinflusst wird. In diesem Fall sprechen wir vom "kapazitiven Widerstand". Die Impedanz bei hohen Frequenzen ist aufgrund der unterschiedlichen biologischen Strukturen frequenzabhängig. Dadurch wird es ermöglicht durch Applikation von Messströmen unterschiedlicher Frequenzen extrazelluläre und zellmembranabhängige, intrazelluläre Veränderungen unabhängig voneinander zu erfassen.

Bei niedrigen Frequenzen fließt der Strom zusätzlich über die Gap Junctions, über die Membranen und über die dünne Schicht der extrazellulären Flüssigkeit, die sich zwischen den Membranen befindet (Gersing et al., 1991). Den Gap Junctions, die die Verbindung zwischen den Zellen darstellen, wird ein Widerstandsverhalten zugesprochen, das die Kapazität der Zellmembran partiell überbrücken kann (Müller et al., 1991). Wenn in Abhängigkeit der Ischämiedauer die Gap Junctions schließen, wird deren Widerstand so groß, dass der Stromfluss bei niedrigen Frequenzen ausschließlich extrazellulär fließt und die Impedanz stark abfällt.

Bei den von uns benutzten Frequenzen von 220Hz ist der kapazitive Widerstand  $C_m$  der Zellmembran noch hoch, der parallelgeschaltete Widerstand  $R_g + R_i$  steigt gegen

unendlich und die Impedanz erreicht maximal die Höhe von  $R_e$  (siehe *Abb. 1*). Bei Messungen im MHz-Bereich - in dieser Arbeit 1 MHz - ist der kapazitive Widerstand dagegen klein, wodurch die Impedanz durch die Ohmschen Widerstände determiniert wird. Während einer Ischämie fällt der Realteil (Ohmscher Widerstand) der Impedanz bei hohen Frequenzen ab, die Leitfähigkeit des intra- und extrazellulären Milieus nimmt dagegen zu. Diese Zunahme muss auf die Zunahme der Metabolite der anaeroben Glykolyse (u.a. Laktat) zurückgeführt werden. Die ischämiebedingten Veränderungen der Leber lassen sich auf zwei Mechanismen zurückführen: Einerseits kommt es zum Schluss der Gap Junctions in Abhängigkeit von der Ischämiedauer, womit eine Zunahme des intrazellulären Widerstandes verbunden ist und andererseits entwickelt sich ein intrazelluläres Ödem, das zu einer Zunahme des extrazellulären Leitungswiderstandes und einer Einschränkung des Extrazellulär-raums führt. Die Entkopplung der Gap Junctions ist auf eine ischämieinduzierte zelluläre ATP- Abnahme zurückzuführen, sowie auf den Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$  und  $H^+$  Konzentration.

Es muss diskutiert werden, dass die Veränderungen des dielektrischen Spektrums Folge intraintraischämischer Veränderungen interzellulärer Verbindungen sind (Schaefer et al., 2002). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Gap Junction- Verschlüsse Zeichen einer frühen Zellschädigung während einer Ischämie, die noch keine irreversiblen Schäden hervorgerufen hat, darstellen. Das Limit der Reversibilität ist abhängig von der Temperatur, den Energiereserven und dem Gewebetyp und wird früher erreicht, als die morphologischen Veränderungen. Die Auflösung der Zellmembran findet erst unter maximaler Ischämiebelastung statt, wenn das Gewebe nicht mehr wiederbelebbar ist (Gheorghiu und Gersing, 2002; Schmiedl et al., 1996) .

Die Lebertransplantation hat sich dank der Fortschritte auf den Gebieten der Immunsuppression, der Verbesserung chirurgischer Techniken und der Organkonservierung mittels Hypothermie und Protektionslösungen weltweit etabliert. Dadurch konnte die Langzeitprognose nach Lebertransplantation erheblich verbessert werden. Zahlreiche Arbeiten belegen, dass durch die Anwendung optimierter Konservierungstechniken der ischämische Zellschaden vermindert werden kann (Adam et al., 2015; Ben Mosbah et al., 2006; Cavallari et al., 2003; Erhard et al., 1994; Fingas et al., 2011; Lema Zuluaga et al., 2013;

Meine et al., 2006, 2015; Parsons und Guarrera, 2014; Rayya et al., 2008; Wiederkehr et al., 2014; Zaouali et al., 2011) .

Bei der Gegenüberstellung unserer Messungen der reinen Leberischämie bei 35 °C und 5 °C lässt sich anhand des EZRI der positive Effekt der Hypothermie erwartungsgemäß eindrucksvoll darstellen. Der initiale Abfall des EZRI unter 5°C vollzieht sich deutlich langsamer als unter 35°C. Dieser Effekt muss auf die verzögerte intrazelluläre Schwellung unter der Hypothermie zurückgeführt werden.

Je stärker der Zelluntergang ist, desto größer wird der Extrazellularraum, da die Zahl der isolierenden Membranen abnimmt, wodurch der EZRI steigt. Unter nahezu normothermen Bedingungen steigt der EZRI steil an und erreicht einen nominalen Wert von 1, was gleichbedeutend mit einem totalen Zell- und Membranzerfall ist. Konsequenterweise nimmt dann die Leitfähigkeit kontinuierlich zu. Bezogen auf unseren Schaltkreis aus *Abb. 3* lässt sich ableiten, dass bei 35°C ab diesem Zeitraum die Membranauflösung und Zellzerstörung bis hin zum Zelltod erkennbar wird.

Im Gegensatz dazu bleibt unter 5°C eine entsprechende Änderung der Werte aus, DZ und EZRI bleiben konstant auf gleichem Niveau. Somit ist zu postulieren, dass bei Anwendung der Ischämie von 5°C in unserem Versuchsmodell über die gesamte Beobachtungszeit die Eigenschaft der elektrischen Isolation bestehen bleibt. In den Messungen bei 5°C erkennt man, dass die DZ bei niedrigen Frequenzen (220 Hz, 13 kHz) initial stark abfällt, hingegen bei hohen Frequenzen (1 MHz) ansteigt. Parallel dazu fällt die Leitfähigkeit  $\sigma$  ab.

Ein Gap Junction Verschluss muss ab dem Zeitpunkt angenommen werden, wo die DZ bei niedrigen Frequenzen stark abfällt, bei hohen Frequenzen im gleichen Zeitraum aber ansteigt und die Leitfähigkeit  $\sigma$  in dieser Periode absinkt. Wenn man diese Hypothese auf die von uns durchgeführten Messungen überträgt, könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass ein frühzeitiger Gap Junction Verschluss stattfindet.

Das Postulat, dass der Gap Junction Verschluss bei niedrigen Temperaturen sehr früh stattfindet, wurde durch Arbeiten von Schäfer et al. (2002) belegt. Zur Bestätigung wird der Heptanol-Versuch genutzt (*Abb. 18-21*). Heptanol ist ein Zellgift, das direkten Einfluss auf die Gap Junctions ausübt und sie verschließt.

Wenn man die Kurvenverläufe dieser Heptanolversuche und der reinen Ischämie (Abb. 5-10) hinsichtlich der Dielektrizitätszahl und der Leitfähigkeit vergleicht, so kann man erkennen, dass die reine Ischämie bei 35 °C zu dem gleichen Einfluss auf die Gap Junctions wie das Heptanol führt. Unter Heptanol fällt die DZ bei 220 Hz stark ab, steigt hingegen bei 13 kHz stark an, während die Leitfähigkeit bei 13 kHz abfällt. Der Gap Junction Verschluss findet innerhalb von 5 Minuten nach Heptanolgabe statt, bei reiner Ischämie unter 35 °C nach ca. 15 Minuten. Der unerwartete spätere Abfall der DZ bei 13 kHz im Heptanol- Versuch wird möglicherweise durch einen direkten Heptanolschaden hervorgerufen. Jedoch lässt sich mit den Heptanol- Versuch zeigen, dass bei Anwendung einer Protektionslösung eine deutlich spätere Ischämiereaktion auftritt.

Der positive Effekt protektiver Lösungen hinsichtlich des Gap Junction Verschlusses lässt sich auch anhand der HTK- Lösung zeigen, da der oben genannte Einfluss auf die Gap Junctions in allen Frequenzbereichen verspätet auftritt, wie die Kurvenverläufe von EZRI und  $\sigma$  bei 13 kHz deutlich machen. Die Kurvenverläufe unterstützen die Hypothese, dass der verzögerte Abfall bei den HTK- Kurven durch den verspäteten Gap Junction Verschluss hervorgerufen wird.

Um die Organprotektion weiter zu verbessern, ist es erforderlich, Ischämieschäden zu analysieren und gegebenenfalls zu verhindern. Diese Schäden können zunächst durch die Hypothermie während der Ischämie reduziert werden. Eine Reduktion der Organ-temperatur vermindert einerseits die zelluläre metabolische Aktivität, führt aber dennoch zu einem ATP- Verlust der Hepatozyten. Die ablaufenden Prozesse verbrauchen mehr Energie als bereitgestellt werden kann. Die anaerobe Glykolyse steht als Energielieferant zur Verfügung, jedoch mit der Konsequenz, dass Laktat - als Endprodukt der Glykolyse - gebildet wird, was zu einer intrazellulären Azidose führt (Meißner, 1999). Der entstehende Substratmangel beeinträchtigt zusätzlich die Funktion der Natrium/Kalium-ATPase, wodurch eine intrazelluläre Natrium-Akkumulation entsteht. Mit dem Natrium strömen Chlorid-Ionen in die Zelle, während Kalium-Ionen dem Konzentrationsgefälle folgend aus der Zelle diffundieren. Diese Ionenverschiebungen führen zu einem Wassereinstrom mit Bildung eines intrazellulären Ödems.

In unseren Untersuchungen verzichteten wir bewusst auf Messungen bei Temperaturen von 5 °C und 35 °C unter Verwendung von Protektionslösungen, da bereits in der Arbeit

von Gerhard Kehrer zur Energetik und Impedanz der ischämischen Leber von 1991 anhand der Phasenwinkelverläufe ausreichend gezeigt werden konnte, dass die Protektion mit kalten Lösungen bei 5°C wesentlich effektiver ist als bei 35°C. 1988 wurde die Belzer- University of Wisconsin (UW- Lösung) zur Protektion der Leber bei Transplantationen eingeführt. Seither wird diese Lösung zur Leberprotektion weltweit eingesetzt.

Durch die Konservierungslösungen soll während der Ischämie den ischämiebedingten Veränderungen entgegengewirkt werden. Zentrale Punkte dieser Ischämieschäden sind der zelluläre Energieverlust und die zuvor erwähnte zelluläre Azidose. Die Anreicherung der UW-Lösung mit energiereichen Phosphaten soll in der frühen postischämischen Phase der Wiederherstellung der Zellfunktionen aus energetischer Sicht dienen. Die beiden Substanzen - Allopurinol und Gluthation - fungieren als Radikalfänger. Das Zellödem soll durch Laktobionat und Raffinose minimiert werden. Die UW-Lösung ist bewusst glucosefrei, um die anaerobe Laktatbildung nicht zu verstärken.

Als einzige der klinisch relevanten Protektionslösungen enthält UW HAES zur Stabilisierung des onkotischen Drucks und des Extrazellulärraums. Dadurch wird allerdings die Viskosität der Lösung erhöht, was die homogene Aquilibrierung der Leber während der präischämischen Perfusion erschwert. Bei der Verwendung der UW- Lösung wirkt sich der hohe Kalium-Anteil in der Lösung nachteilig aus, da das Risiko eines hyperkalämischen Herzstillstandes auftritt. Zusätzlich führen Mikropartikel in der Lösung zu einer inhomogenen Perfusion, so dass die UW-Lösung nur unter Verwendung von Filtern verwendet werden kann.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der von Bretschneider Mitte der 70er Jahre entwickelten HTK- Lösung um eine niedrig visköse kolloide Lösung. Diese Lösung ist die erste Lösung mit einem hochkonzentrierten Puffer, dem Histidin/Histidin-HCL. Der erste klinische Einsatz der HTK- Lösung in der Leberchirurgie fand 1988 statt. Sie gewährleistete eine sehr gute Transplantatfunktion, auch nach sehr langer kalter Aufbewahrung. Die Bretschneider Lösung HTK zeichnet sich durch einen niedrigen Natrium- Calcium Gehalt aus. Der in der Lösung enthaltene Puffer ist hochkonzentriert und wirkt der Azidose Entwicklung entgegen. Die geringe Viskosität der Lösung garantiert eine schnelle und homogene Durchspülung des Organs. Daraus resultiert eine bessere Erholung der

mikrozirkulatorischen Veränderungen und ein verbesserter biliärer Schutz (Lamesch et al., 1991; Ringe et al., 2005; Wiederkehr et al., 2014).

Ein weiteres Konzept zur Leberprotektion wurde 1997 am Institut Georges Lopez entwickelt, die Protektionslösung -IGL-, welche der UW- Lösung nach Belzer ähnelt. Die Hydroxyethylstärke (HEAS) wurde in IGL-1 durch Polyethylenglykol ersetzt, wodurch die Viskosität und damit die Gefahr einer Blutkörperchen- Aggregation gemindert wurde (Zaouali et al., 2011). Weiterhin wurde das Verhältnis von Kalium im Vergleich zur UW-Lösung umgekehrt. Die Verwendung von Gluthation soll die antioxidativen Eigenschaften der IGL-Lösung verstärken (Ben Mosbah et al., 2006; Maathuis et al., 2008; Meine et al., 2015). Die von uns untersuchten Protektionslösungen unterscheiden sich wesentlich voneinander in ihrer Ionenzusammensetzung ihrer Pufferkapazität und ihrer Viskosität.

Um die Auswirkungen auf das Zellvolumen, die interzellulären Verbindungen und dem Extrazellularraum während der Ischämie zu analysieren, betrachten wir zunächst den EZRI. Alle drei Protektionslösungen, sowie das Kollektiv der reinen Ischämie bei 5 °C weisen einen steilen Abfall des EZRI auf, was auf ein sich entwickelndes Zellödem hinweist.

Das HTK- Kollektiv zeigt eine geringere, nicht signifikante Minderung des Extrazellularraums im Vergleich zu den anderen Kollektiven. HTK, IGL und UW demonstrieren eine signifikant bessere Protektivität als die reine Ischämie bei 5 °C ( $t(250):p=0.003$  +  $t(400):p=0.001$ ).

Besonders interessant ist das Verhalten des EZRI bei 35 °C (reine Ischämie). Bereits nach 40 Minuten erreicht der EZRI seinen Tiefpunkt. Alle Protektionslösungen erreichen mit fortschreitender Ischämie ein "steady state" des Zellödems, während die reine Ischämie ab der 120. Minute einen kontinuierlichen Wiederanstieg des EZRI zeigt. Dieser Wiederanstieg ist ein eindeutiges Zeichen für eine Membranauflösung und damit letztlich der Hinweis auf einen irreversiblen Zellschaden. Die Kurvenverläufe der anderen Kollektive sind prinzipiell vergleichbar, jedoch zeigt das HTK-Kollektiv eine nicht signifikant bessere Protektionseffizienz.

Durch die Impedanzmessungen werden die elektrische Permittivität  $\epsilon$  und Konduktivität  $\sigma$  des Lebergewebes festgestellt. Betrachtet man die Messungen der DZ bei 220 Hz ist

eine signifikant ( $t(400);p=0.021$ ) bessere Protektion von HTK im Vergleich zu IGL, UW und reiner Ischämie jeweils bei 5 °C sichtbar. Bei den Protektionslösungen mit IGL, UW, sowie reiner Ischämie ist ein fast identischer Verlauf mit initial stärkerem Abfall der DZ erkennbar. Dieser Abfall muss als Indikator des Verschlusses der Gap Junctions interpretiert werden. Bezüglich dieses Parameters und der daraus abgeleiteten Interpretation wird die höhere Protektionseffizienz der HTK-Lösung evident. Bei unseren Versuchen mit reiner Ischämie 5 °C kann der Gap Junction Verschluss nicht eindeutig identifiziert werden, da in keinem Frequenzbereich ein Anstieg der DZ am Anfang gemessen werden konnte. Die Interpretation dieses Phänomens gestaltet sich schwierig, da mehrere Möglichkeiten für das Fehlen des DZ-Anstiegs in Betracht gezogen werden müssen. Entweder ist der GJV unter diesen Bedingungen messtechnisch nicht erfassbar, oder es stellt sich kein GJV ein. Ein weiterer Grund könnte darin bestehen, dass der GJV bereits frühzeitig stattgefunden hat.

Schäfer et al. (2002) und Knapp et al. (2005) zeigten bereits tierexperimentell den Zusammenhang zwischen einem intraintrischämischen Gap Junction- Verschluss und dem korrelierenden sigmoidalen Anstieg der DZ bei 13 kHz am myokardialen Gewebe (*Abb. 1*). Auch unsere Untersuchungen weisen bei Anwendung aller Protektionslösungen einen sigmoidalen Anstieg auf, wobei der obere Umschlagpunkt der Kurven den Zeitpunkt markiert, an dem alle Gap Junctions verschlossen sind. Bis zu diesem Zeitpunkt sind noch interzelluläre Ionenaustauschprozesse vorhanden, wie Knapp et al. (2005) mit ihren Untersuchungen an Gap Junctions mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow nachweisen konnten (Knapp, 2007).

Die von uns untersuchten Protektionsverfahren lassen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des oberen Umschlagpunktes erkennen, was bedeutet, dass sich die Gap Junctions im gleichen Zeitraum verschließen, jedoch scheint im HTK-Kollektiv der GJV später zu erfolgen.

Geht man bei der Diskussion von dem Ersatzschaltbild (*Abb. 3*) aus, so ist der Membranwiderstand bei hohen Frequenzen vernachlässigbar, wodurch die Impedanz nur durch die Ohmschen Widerstände determiniert wird. Unter Ischämiebedingungen fällt der Realteil der Impedanz bei 1 MHz ab, da die Leitfähigkeit des intrazellulären Raums durch die Glykolyseendprodukte und das ischämiebedingte Ödem zunimmt.

Unabhängig von den Protektionslösungen ist bei unseren Untersuchungen ein initialer steiler Abfall der DZ nachweisbar. Anschließend geht die DZ in eine Plateauphase über. Diesbezüglich unterscheiden sich die Protektionsverfahren. Nach längerer Ischämiezeit - etwa ab der 250. Minute - steigt die DZ bei UW und IGL wieder an, während im HTK-Kollektiv eine kontinuierliche Abnahme zu verzeichnen ist. Der Wiederanstieg der DZ in den beiden zuvor genannten Kollektiven muss als eine im Vergleich zum HTK-Kollektiv schlechtere Protektion interpretiert werden, wenn man das Verhalten der DZ bei den Versuchen mit reiner Ischämie bei 35 °C zugrunde legt.

Mit unserem Versuchsaufbau bzw. unseren Ergebnissen wird die klinische Erfahrung, dass die reine Hypothermie einen unzureichenden Organschutz bei der Transplantation bietet, experimentell untermauert und gleichzeitig die Bedeutung eines Protektionsverfahrens evident. Die bei anderen Untersuchungen nachgewiesenen Unterschiede zwischen den Kollektiven müssen auf die unterschiedlichen Zusammensetzungen zurückgeführt werden, da die Ischämiebelastung der untersuchten Lebern in allen Kollektiven gleich war.

Schnabel et al. (1987) konnten nachweisen, dass sowohl die Entwicklung, als auch die Reversibilität von ischämiebedingten Schäden der Endothelzellen am Myokard von der Zusammensetzung der verwendeten Protektionslösungen abhängt, wobei kaliumreiche Lösungen einen ungünstigen Einfluss zu haben scheinen. Ein wesentlicher Vorteil der Bretschneider Lösung HTK besteht daher einerseits in dem niedrigeren Kalium-Gehalt, andererseits in der Natrium-Konzentration, die der intrazellulären Konzentration entspricht. In Kombination mit der drastischen Reduktion des Calcium-Gehaltes bedingt sie eine höhere Protektionseffizienz im Vergleich zur IGL- bzw. UW-Lösung (Maathuis et al., 2008). Darüber hinaus erweisen sich die niedrigere Viskosität, vor allem aber die hohe Pufferkonzentration der HTK-Lösung als entscheidende Parameter bezüglich einer optimierten Leberprotektion. Der antioxidative Effekt von Nitroxid in der IGL-Lösung ist im Vergleich zur HTK-Lösung schwächer, da die Konzentration der in der Lösung enthaltenen Radikalfänger (Histidin, Mannitol) in der Frühphase der postischämischen Reperfusion deutlich höher ist. Im Vergleich zur UW-Lösung zeigt die IGL-Lösung eine verbesserte Protektion, wie auch die Untersuchungen von Ben Abdennebi et al (2006) beim Vergleich von UW und IGL an der Schweineleber belegen (Franco-Gou et al., 2007;

Zaouali et al., 2010). Der Ischämieschaden nach Anwendung von IGL war deutlich geringer, was auf die Zugabe von modifiziertem Polyethylen und der damit einhergehenden geringeren Viskosität zurückgeführt werden kann.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Leberprotektion bei Transplantationen auf jeden Fall unter Hypothermie durchgeführt werden sollte. Die Anwendung von Protektionslösungen stellt eine *conditio sine qua non* dar.

Die Ischämietoleranz von Organen wird zusätzlich durch die freien Sauerstoffradikale beeinflusst. Während Ischämie kommt es zu einer Aktivierung oxidativer Reaktionen, bei denen freie Sauerstoffradikale freigesetzt werden, die unter anderem zu einer Schädigung an Gefäßendothelien führen. Bei dem Abbau von energiereichen Phosphaten in den Hepatozyten durch die Xanthinoxidase werden freie Sauerstoffradikale gebildet. Die Lösungen UW und IGL enthalten Allopurinol und Gluthation, welche die Xanthinoxidase blockieren und die Bildung der freien Sauerstoffradikale inhibieren sollen. In den Untersuchungen von Lamesch et al. (1991) und unseren Untersuchungen konnte im Vergleich zu HTK keine verbesserte Protektion durch IGL und UW nachgewiesen werden. In den drei genannten Lösungen werden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zum Abfangen von freien Radikalen verfolgt: in der IGL- und der UW-Lösung wird Allopurinol verwendet, während in der HTK-Lösung Histidin und Mannitol zur Verfügung stehen, wie zuvor bereits aufgeführt. Damit erfüllt das Histidin zwei Funktionen, zum einen als Radikalfänger und zum anderen als Puffersubstanz. Das in der IGL-Lösung enthaltene Polyethylen soll einen anti-inflammatorischen Effekt ausüben, wie Hauet et al. (2002) zeigen konnten. Jedoch konnten diese Ergebnisse, die bei der Schweineherz-Transplantation gewonnen wurden, durch Ben Abdennebi et al. (2006) an der Schweineleber im Vergleich von UW und IGL nicht bestätigt werden.

Inwieweit der Chlorid-Anteil in einer Protektionslösung sich protektiv erweist, kann nur spekuliert werden. Fingas et al. (2011) verglichen im Rattenlebermodell den Einfluss von Chlorid in den Perfusionslösungen. Messungen der Aktivitäten von Leberenzymen in der Reperfusionphase machten deutlich, dass nach Anwendung einer chloridreichen Lösung niedrigere Aktivitäten gemessen wurden (Fingas et al., 2011). Im Vergleich von IGL und HTK ist der Chlorid- Anteil in der HTK-Lösung doppelt so hoch. Bezüglich der UW-

Lösung muss berücksichtigt werden, dass die protektive Wirkung des hohen Chlorid- Anteils durch die gleichzeitig hohe Kalzium- Konzentration negativ beeinträchtigt wird.

Schäfer et al. (2018, 2019) untersuchten den Einfluss des Calcium- Gehaltes in den Protektionslösungen für die Reperfusionsphase. Gap Junction Verschlüsse werden durch Calcium ausgelöst, wenn die intrazelluläre Calcium- Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschreitet (Dhein und Salameh, 2017). Im Umkehrschluss bedeutet es, dass je niedriger die extrazelluläre Calcium-Konzentration ist, desto später tritt der GJV während der Ischämie auf. Wenn diese Hypothese stimmt, müssten der GJV im IGL- und UW-Kollektiv später stattfinden, als nach Verwendung der HTK-Lösung. Ein GJV kann angenommen werden, wenn bei niedrigen Frequenzen (220 Hz) die DZ abfällt und bei hohen Frequenzen (13 kHz) ansteigt und die Leitfähigkeit im gleichen Zeitraum im gesamten Frequenzspektrum abfällt. Aufgrund dieses Postulats können wir den kompletten GJV für IGL bei etwa 100 Minuten und für UW bei etwa 150 Minuten annehmen, während für HTK der endgültige Verschluss bei etwa 200 Minuten postulierbar ist. Es muss aber gleichzeitig betont werden, dass sich eine zeitlich exakte Festlegung schwierig gestaltet.

Anhand dieser Ergebnisse scheint der Einfluss des Calciums auf den GJV eine untergeordnete Rolle zu spielen

Weltweit werden heute alle drei untersuchten Lösungen zu Lebertransplantationen eingesetzt. Ihre Zusammensetzungen sind sehr unterschiedlich, wodurch die Messungen der elektrischen Impedanz in spezifischer Weise beeinflusst werden. Dadurch wird folgerichtig die Interpretation der Messergebnisse erschwert. Dennoch bietet die Impedanzmessung Möglichkeiten ischämiebedingte zelluläre Veränderungen frühzeitig und kontinuierlich zu erfassen, wie z.B. die Ödementwicklung. Eine Gesamtbeurteilung der Protektionseffizienz ist daher mit diesem Verfahren tendenziell möglich. Für den kurzzeitigen Protektionsschutz sind alle drei Lösungen geeignet. Erst nach hoher Ischämiebelastung werden Unterschiede evident, so dass wir schlussfolgern können, dass die HTK-Lösung den beiden anderen überlegen zu sein scheint.

Bei unseren Untersuchungen sind wir von einer isolierten, nicht perfundierten Leber ausgegangen. In der Lebertransplantationschirurgie hat in den letzten Jahren ein Wandel in der Vorgehensweise stattgefunden, so dass in zunehmendem Maße die zu transplantierende Leber während der Ischämie maschinell perfundiert wird. Dadurch sind vollkommen andere pathophysiologische Bedingungen gegeben. Unsere Untersuchungen sind aber keinesfalls durch diese aktuelle chirurgische Vorgehensweise überholt oder sogar überflüssig, denn durch die Impedanzmessungen kann der Einfluss der Lösungszusammensetzungen auf die Protektionseffizienz in einem experimentell neuen Ansatz untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Um die Effektivität von Protektionsverfahren während Ischämie zu untersuchen, wurden die passiven elektrischen Eigenschaften des Gewebes über die Messung der bioelektrischen Impedanz genutzt, um ischämiebedingte Schäden des Lebergewebes aufzudecken.

Protektionslösungen unterschiedlicher Zusammensetzung verzögern die Gap- Junction-Entkopplung gegenüber der reinen Ischämie.

In der Leber führt tiefere Hypothermie sowohl unter rein ischämischen Bedingungen, als auch unter Konservierung mit Protektionslösungen, zu erheblich längeren Öffnungszeiten der Gap- Junctions. Zudem ist eine Konservierung mit HTK, UW oder IGL wesentlich effektiver als alleinige Ischämie oder Hypothermie.

Auch wenn längst nicht alle Mechanismen bekannt sind, welche die Protektion in den Zellen hervorruft, kann man anhand dieser elektrischen Impedanzmessungen eine klare Protektion der Lösungen auch in Abhängigkeit von der Temperatur detektieren, insbesondere von HTK.

## 6 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Schematic diagram of a stylized sigmoidal time course of the dielectric permittivity $\epsilon$ at 13 kHz during myocardial ischemia .....	11
<b>Abb. 2:</b>	Darstellung des operativen Situs und der technischen Abläufe .....	14
<b>Abb. 3:</b>	Erweitertes Ersatzschaltbild zur Erklärung der elektrischen Impedanz von Gewebe unter Berücksichtigung der Gap Junctions .....	19
<b>Abb. 4:</b>	Vergleich des EZRI während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 24 h .....	22
<b>Abb. 5:</b>	Vergleich der DZ bei 220 Hz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 5 h .....	24
<b>Abb. 6:</b>	Vergleich der DZ bei 13 kHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h .....	24
<b>Abb. 7:</b>	Vergleich der DZ bei 112 kHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h .....	25
<b>Abb. 8:</b>	Vergleich der DZ bei 1 MHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h .....	25
<b>Abb. 9:</b>	Vergleich der Leitfähigkeit $\sigma$ bei 13 kHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 8 h .....	27
<b>Abb. 10:</b>	Vergleich der Leitfähigkeit $\sigma$ bei 1 MHz während reiner Ischämie bei 5 °C und 35 °C bei der Rattenleber im zeitlichen Verlauf über 5 h .....	27
<b>Abb. 11:</b>	Vergleich des EZRI von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h .....	29
<b>Abb. 12:</b>	Vergleich der Dielektrizitätszahl bei 220 Hz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h .....	30
<b>Abb. 13:</b>	Vergleich der DZ bei 13 kHz von HTK, UW und IGL bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 12,5 h .....	31
<b>Abb. 14:</b>	Vergleich der DZ bei 112 kHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h .....	32
<b>Abb. 15:</b>	Vergleich der DZ bei 1 MHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h .....	33
<b>Abb. 16:</b>	Vergleich der Leitfähigkeit $\sigma$ bei 13 kHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h .....	34

- Abb. 17:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 1 MHz von HTK, UW und IGL während Ischämie bei 5 °C in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h..... 35
- Abb. 18:** Vergleich des EZRI bei HTK bei 5 °C und Heptanol während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h..... 36
- Abb. 19:** Vergleich der DZ bei 220 Hz bei HTK bei 5 °C und Heptanol während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h. .... 36
- Abb. 20:** Vergleich der DZ bei 13 kHz bei HTK und HTK+ Heptanol bei 5 °C während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h..... 37
- Abb. 21:** Vergleich der Leitfähigkeit  $\sigma$  bei 13 kHz bei HTK und HTK+ Heptanol bei 5 °C während Ischämie in unterschiedlich protektierten Rattenlebern im zeitlichen Verlauf über 24 h. .... 37

## 7 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Die unterschiedlichen Zusammensetzung der verwendeten Protektionslösungen: HTK, HTK-N, IGL und UW mit ihren Inhaltsstoffen, der Osmolarität und dem pH-Wert.....	17
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 8 Literaturverzeichnis

Adam R, Delvart V, Karam V, Ducerf C, Navarro F, Letoublon C, Belghiti J, Pezet D, Castaing D, Le Treut YP, Gugenheim J, Bachellier P, Pirenne J, Muiesan P. Compared efficacy of preservation solutions in liver transplantation: a long-term graft outcome study from the European Liver Transplant Registry. *Am J Transplant* 2015; 15: 395-406

Argentieri TM, Frame LH, Colatsky TJ. Electrical properties of canine subendocardial Purkinje fibers surviving in 1-day-old experimental myocardial infarction. *Circ Res* 1990; 66: 123-134

Ben Abdennebi H, Elrassi Z, Scoazec JY, Steghens JP, Ramella-Virieux S, Boillot O. Evaluation of IGL-1 preservation solution using an orthotopic liver transplantation model. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5326-5330

Ben Mosbah I, Rosello-Catafau J, Franco-Gou R, Abdennebi HB, Saidane D, Ramella-Virieux S, Boillot O, Peralta C. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transpl* 2006; 12: 1215-1223

Braathen B, Jeppsson A, Schersten H, Hagen OM, Vengen O, Rexius H, Lepore V, Tonnessen T. One single dose of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution gives equally good myocardial protection in elective mitral valve surgery as repetitive cold blood cardioplegia: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141: 995-1001

Cavallari A, Cillo U, Nardo B, Filipponi F, Gringeri E, Montalti R, Vistoli F, D'Amico F, Faenza A, Mosca F, Vitale A, D'Amico D. A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: 814-821

Couinaud C. Bases anatomiques des hepatectomies gauche et droite reglees, techniques qui en deroule. *J Chir* 1954; 70: 933-966

De Mello WC. Cell-to-cell coupling assayed by means of electrical measurements. *Experientia* 1987; 43: 1075-1079

Dhein S, Salameh A. Kardiale "gap junctions". Cardiac gap junctions. Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie 2017; 31

Ellenby MI, Small KW, Wells RM, Hoyt DJ, Lowe JE. On-line detection of reversible myocardial ischemic injury by measurement of myocardial electrical impedance. Ann Thorac Surg 1987; 44: 587-597

Engelmann TW. Über die Leitung der Erregung im Herzmuskel. Pflügers Archiv 1875; 11: 465-480

Engelmann TW. Vergleichende Untersuchungen zur Lehre von der Muskel- und Nerven elektrizität. Pflügers Arch 1877; 15: 116-148

Erhard J, Lange R, Gersing E, Scherer R, Gebhard MM, Sanchez P, Bretschneider HJ, Eigler FW. Die Impedanzmessung zur Beurteilung von Ischämieschäden der humanen Leber in der Vorbereitung zur Transplantation. Langenbecks Archiv für Chirurgie 1993; 378: 233-238

Erhard J, Lange R, Gersing E, Scherer R, Gebhard MM, Sanchez P, Bretschneider HJ, Eigler FW. Measuring impedance for evaluating ischemia damage to the human liver in preparation for transplantation. Langenbecks Arch Chir 1993; 378: 233-238

Erhard J, Lange R, Scherer R. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. Transpl Int 1994; 7: 177-181

Fingas CD, Wu S, Gu Y, Wollschlaeger J, Scherag A, Dahmen U, Paul A, de Groot H, Rauen U. Assessment of a chloride-poor versus a chloride-containing version of a modified histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in a rat liver transplantation model. Liver Transpl 2011; 17: 650-660

Franco-Gou R, Mosbah IB, Serafin A, Abdennebi HB, Rosello-Catafau J, Peralta C. New preservation strategies for preventing liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22: 1120-1126

Gebhard MM, Gersing E, Brockhoff CJ, Schnabel PA, Brettschneider HJ. Impedance spectroscopy: a method for surveillance of ischemia tolerance of the heart. *Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 35: 26-32

Gersing E. Impedanzspektroskopie als Hilfe bei Herzoperationen. *Elektronik* 1982; 9: 88-90

Gersing E. Measuring electrical impedance of organs--instrumental equipment for research and clinical use. *Biomed Tech (Berl)* 1991; 36: 6-11

Gersing E. Monitoring temperature-induced changes in tissue during hyperthermia by impedance methods. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 873: 13-20

Gersing E, Bach F, Brockhoff C, Gebhard MM, Kehrer G, Meissner A, Brettschneider HJ. Messung der elektrischen Impedanz von Organen--Methodische Grundlagen. *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering* 1991; 36: 70-77

Gersing E, Schaefer M, Osypka M. The appearance of positive phase angles in impedance measurements on extended biological objects. *Innov. Technol. Biol. Med* 1995; 16: 71-76

Gersing E, Preusse CJ, Gebhardt MM, Brettschneider HJ. Use of electrical impedance spectroscopy for surveillance of the myocardial ischemic stress. *Pflügers Arch* 1981; 389: 359-365

Gettes LS. Effect of ischemia on cardiac electrophysiology. Fozzard HA et al. *The Heart and Cardiovascular System*, New York, Raven Press 1986; 1317-1341

Gheorghiu MG, Gersing E. Revealing alteration of membrane structures during ischemia, using impedance spectroscopy. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 2002; 777-787

Goodenough DA, Gilula NB. The splitting of hepatocyte gap junctions and zonulae occludentes with hypertonic disaccharides. *J Cell Biol* 1974; 61: 575-590

Hardy KJ. Liver surgery: the past 2000 years. *Aust N Z J Surg* 1990; 60: 811-817

Hauet T, Goujon JM, Baumert H, Petit I, Carretier M, Eugene M, Vandewalle A.

Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. *Kidney Int* 2002; 62: 654-667

Healey JE jr, Schroy PC. Anatomy of the biliary ducts within the human liver; analysis of the prevailing pattern of branchings and the major variations of the biliary ducts. *AMA Arch Surg* 1953; 66: 599-616

Ivorra A, Genesca M, Sola A, Palacios L, Villa R, Hotter G, Aguilo J. Bioimpedance dispersion width as a parameter to monitor living tissues. *Physiol Meas* 2005; 26: 165-173

Jain SK, Schuessler RB, Saffitz JE. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. *Circ Res* 2003; 92: 1138-1144

Karp SJ. Clinical implications of advances in the basic science of liver repair and regeneration. *Am J Transplant* 2009; 9: 1973-1980

Kaushal S, Wehman B. New model for an old problem: Myocardial edema and dysfunction in neonates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016; 152: 655

Kehrer G. Energetik und Impedanz der ischämischen Leber. Beiträge zur Transplantationsmedizin 1993; 14. Vol. Lengerich [u.a.]

Kehrer G, Aminimalai A, Gersing E, Lamesch P, Meissner A, Schareck WD, Richter J, Brettschneider HJ. Glycogen effects on energy state and passive electric properties of liver during protection. *Z Gastroenterol* 1990; 28: 147-156

Klaunig JE, Ruch RJ. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab Invest* 1990; 62: 135-146

Knapp J. Dielektrische Spektroskopie als Methode zur Analyse der elektrischen Zellentkopplung am Mäuseherzen unter Ischämie. 2007

Knapp J, Gross W, Gebhard MM, Schaefer M . Surface contact measurement of electrical cell uncoupling in the mouse heart during ischemia. *Bioelectrochemistry* 2005; 67: 67-73

Korf J, Postema F. Rapid shrinkage of rat striatal extracellular space after local kainate application and ischemia as recorded by impedance. *J Neurosci Res* 1988; 19: 504-510

Lambotte L, Wojcik S, Pontegnie-Istace S. Biophysical and biochemical methods of evaluation of preserved livers. *Acta Med Pol* 1978; 19: 43-52

Lamesch P, Raygrotzki S, Kehrer G, Gubernatis G, Ringe B, Evers B, Yacoub EA, Pichlmayr R. In-situ-Protektion der Leber mit der HTK-Lösung nach Bretschneider. *Langenbecks Archiv fur Chirurgie* 1991; 376: 85-92

Lema Zuluaga GL, Serna Agudelo RE and Zuleta Tobon JJ. Preservation solutions for liver transplantation in adults: celsior versus custodiol: a systematic review and meta-analysis with an indirect comparison of randomized trials. *Transplant Proc* 2013; 45: 25-32

Linhart H. Die niederfrequente elektrische Impedanz des ischämischen Myokards. 1995

Loewenstein WR. The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 1987; 48: 725-726

Loewenstein WR, Kanno Y. Studies on an Epithelial (Gland) Cell Junction. I. Modifications of Surface Membrane Permeability. *J Cell Biol* 1964; 22: 565-586

Lueck S, Delis A, Minor T, Preusse CJ, Schaefer M. Age-related differences of intraischemic gap junction uncoupling in hearts during ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016; 152: 729-736

Maathuis MH, Ottens PJ, van Goor H, Zwaagstra JJ, Wiersema-Buist J, Schuurs TA, Ploeg RJ, Leuvenink HG. Static cold storage preservation of ischemically damaged kidneys. a comparison between IGL-1 and UW solution. *Transpl Int* 2008; 21: 473-482

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Baker TS, Goodenough DA . Gap junction structures. VI. Variation and conservation in connexon conformation and packing. *Biophys J* 1984; 45: 208-218

McNutt NS, Weinstein RS. The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze-cleave study. *J Cell Biol* 1970; 47: 666-688

Meine MH, Leipnitz I, Zanotelli ML, Schlindwein ES, Kiss G, Martini J, de Medeiros Fleck A jr, Mucenic M, de Mello Brandao A, Marroni CA, Craco Cantisani GP. Comparison Between IGL-1 and HTK Preservation Solutions in Deceased Donor Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2015; 47: 888-893

Meine MH, Zanotelli ML, Neumann J, Kiss G, de Jesus Grezzana T, Leipnitz I, Schlindwein ES, Fleck A jr, Gleisner AL, de Mello Brandao A, Marroni CA, Cantisani GP. Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or histidine-tryptophan-ketoglutarate solutions in liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 1872-1875

Meißner W. Vergleich verschiedener Konservierungslösungen in der Langzeitperfusion der Leber anhand klinisch-chemischer Parameter. 1999

Mellert F, Winkler K, Schneider C, Dudykevych T, Welz A, Osypka M, Gersing E, Preusse CJ. Detection of (reversible) myocardial ischemic injury by means of electrical bioimpedance. *IEEE Trans Biomed Eng* 2011; 58: 1511-1518

Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 101-134

Müller J, Warnecke H, Grauhan O, Voss A, Pfitzmann R, Nelson B, Cohnert T, Hetzer R. Die Messung der bioelektrischen Impedanz zur Abstoßungsdiagnostik nach Herztransplantation. *Acta Chirurgica Austriaca* 1991; 23: 5-9

Padilla F, Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Soler-Soler J. Protection afforded by ischemic preconditioning is not mediated by effects on cell-to-cell electrical coupling during myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1909-1916

Parsons RF, Guarrera JV. Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: which is best? *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19: 100-107

Preusse CJ, Gebhard MM, Bretschneider HJ. Interstitial pH value in the myocardium as indicator of ischemic stress of cardioplegically arrested hearts. *Basic Res Cardiol* 1982; 77: 372-387

Preusse CJ, Gersing E, Gebhard MM, Ponizy A, Schnabel PH, Bretschneider HJ. Intraoperative atraumatic monitoring of myocardial revivability by continuous or intermittent measurement of electrical impedance of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 30: 30

Preusse CJ, Mellert F, Nill C, Winkler K, Gersing E. Evaluation of reversible ischemic injury during open heart surgery by impedance spectroscopy. In: *J. Bioelectromagn* 2003; 5: 29

Rayya F, Harms J, Martin AP, Bartels M, Hauss J, Fangmann J. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in adult liver transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40: 891-894

Reith HB. Historisches zum Lebertrauma. *Chir. Gastroenterol* 1995; 11: 11-17

Ringe B, Braun F, Moritz M, Zeldin G, Soriano H, Meyers W. Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution. *Transplant Proc* 2005; 37: 316-319

Rudisuli A, Weingart R. Electrical properties of gap junction channels in guinea-pig ventricular cell pairs revealed by exposure to heptanol. *Pflugers Arch* 1989; 415: 12-21

Schad K. Postischämischer Metabolismus und Funktion von Säuglings- und Kleinkinderherzen in Abhängigkeit von der Ischämiebelastung und dem Myokardprotektionsverfahren. 1990

Schaefer M, Gebhard MM, Gross W. The efficiency of heart protection with HTK or HTK-N depending on the type of ischemia. *Bioelectrochemistry* 2019; 125: 58-69

Schaefer M, Gross W, Ackermann J, Gebhard MM. The complex dielectric spectrum of heart tissue during ischemia. *Bioelectrochemistry* 2002; 58: 171-180

Schaefer M, Gross W, Gebhard MM. Hearts during ischemia with or without HTK-protection analysed by dielectric spectroscopy. *Physiol Meas* 2018; 39: 025002

Schmiedl A, Schnabel PA, Richter J. Cellular edema and alterations in metabolite content in the ischemic and reperfused canine heart following different forms of cardiac arrest. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 1163-1178

Schnabel PA, Gebhard MM, Pomykaj T, Schmiedl A, Preusse CJ, Richter J, Brettschneider HJ. Myocardial protection: left ventricular ultrastructure after different forms of cardiac arrest. *Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 35: 148-156

Scrascia G, Guida P, Rotunno C, De Palo M, Mastro F, Pignatelli A, de Luca Tupputi Schinosa L, Paparella D. Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Brettschneider-HTK and cold blood cardioplegia. *Perfusion* 2011; 26: 427-433

Severs NJ. The cardiac gap junction and intercalated disc. *Int J Cardiol* 1990; 26: 137-173

Spray DC, Burt JM. Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol* 1990; 258: C195-205

Unwin PN. Gap junction structure and the control of cell-to-cell communication. *Ciba Found Symp* 1987; 125: 78-91

Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 1980; 283: 545-549

Verselis V, White RL, Spray DC, Bennett MV. Gap junctional conductance and permeability are linearly related. *Science* 1986; 234: 461-464

Wiederkehr JC, Igreja MR, Nogara MS, Goncalves N, Montemezzo GP, Wiederkehr HA, Wassen MP, Nobrega HA, Zenatti KB, Mori LY, Tudisco MS. Use of IGL-1 preservation solution in liver transplantation. *Transplant Proc* 2014; 46: 1809-1811

Wright TL, Fitz JG, Boyer TD. Hepatic efflux of glutathione by the perfused rat liver: role of membrane potential difference. *Am J Physiol* 1988; 255: G547-555

Zaouali MA, Ben Abdennebi H, Padrissa-Altes S, Alfany- Fernandez I, Rimola A, Rosello-Catafau J. How Institut Georges Lopez preservation solution protects nonsteatotic and steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2011; 43: 77-79

Zaouali MA, Mosbah IB, Abdennebi HB, Calvo M, Boncompagni E, Boillot O, Peralta C, Rosello-Catafau J. New insights into fatty liver preservation using Institute Georges Lopez preservation solution. *Transplant Proc* 2010; 42: 159-161

## 9 Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Anleitung und Betreuung, sowohl der praktischen als auch der theoretischen Arbeit, möchte ich

*Herrn Univ. Prof. (em) Dr. med. Claus Jürgen Preusse*

meinen allerherzlichsten Dank aussprechen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Schäfer aus der Uniklinik Heidelberg für die Unterstützung bei der statistischen Aufarbeitung der Daten und

Frau Dr. med. Sabrina Lück, Uniklinik Münster, für die Einarbeitung in die Thematik.

Auch möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Teresa für die Unterstützung und Geduld von ganzem Herzen bedanken.