

MÖGLICHKEITEN DER KONSERVIERUNG VON ORGANEN ZUM ZWECKE DER TRANSPLANTATION

Possibilities of preservation of organs for transplantation

von

G. ZIMMERMANN ¹⁾

Aus der I. Chirurgischen Abteilung (Vorstand: Prof. Dr. H. Steiner) und
dem Ludwig Boltzmann-Institut für Experimentelle Chirurgie (Leiter: Prof. Dr. O. Boeckl)
der Landeskrankenanstalten Salzburg

Das zunehmende Interesse an der Organtransplantation und die Tatsache, daß schon heute die Nierentransplantation vielerorts zu den therapeutischen Routineverfahren zählt, lassen die Frage nach einer geeigneten Organkonservierung verständlich erscheinen. Zwei Punkte sind es im wesentlichen, die in letzter Zeit den Ansporn zu intensiven experimentellen Arbeiten auf diesem Gebiet gaben:

1. **Die zunehmende Zahl der klinischen Transplantationen** erfordert eine zunehmende Zahl an Spenderorganen. Der Bedarf an geeigneten Spenderorganen wird aber darüber hinaus deswegen noch akuter, weil auf Grund der Testergebnisse der Histokompatibilitätsgrade für einen bestimmten Empfänger nur eine beschränkte Zahl von Spenderorganen in Frage kommt. Der mit dem Empfänger kompatible Spender ist aber oftmals nur an einem anderen Ort und in einer mehr oder weniger großen zeitlichen Differenz zur vorgesehenen Transplantation verfügbar. Dieser Umstand erfordert eine internationale und sogar interkontinentale Kommunikation, wie dies z.B. mit dem sogenannten "Eurotransplant" verwirklicht wurde, an den Österreich mit dem "Austrotransplant" angegliedert ist.

Um nun die zeitliche und örtliche Distanz überwinden zu können, ist daher eine Konservierung des Spenderorgans notwendig. Optimal wäre eine Langzeitkonservierung, die den Aufbau einer Organbank ermöglichen könnte, in welcher ein Pool von Organen mit den verschiedensten Qualitäten im HLA-Histokompatibilitätssystem gehortet würde. Bei Bedarf könnte das passende Organ ausgesucht werden.

1) Anschrift des Verfassers: Doz. Dr. G. Zimmermann, I. Chirurgische Abteilung, Landeskrankenanstalten, A-5020 Salzburg

2. **Neben den genannten Umständen zeichnet sich für die Zukunft der Organtransplantation eine Entwicklung ab**, die wahrscheinlich nur mit Hilfe einer Langzeitkonservierung der Spenderorgane realisierbar ist: vorläufige experimentelle Daten weisen darauf hin, daß die immunologische Transplantatabstoßung durch Induzierung von Immuntoleranz bzw. durch das sogenannte Enhancement hintangehalten werden kann. Immuntoleranz läßt sich durch Vorbehandlung des Empfängers — vor der Transplantation — unter Zuhilfenahme der Histokompatibilitätsantigene des prospektiven Spenders erzielen. Dies bedeutet aber, daß das Spenderorgan bis zum Abschluß der Vorbehandlung des Empfängers vital erhalten werden muß. Da ja der Spender — etwa ein irreversibel Hirngeschädigter — diese Zeitspanne meist nicht lebend überbrücken kann, gelingt dies nur durch die Konservierung des Organs.

Bei den anfänglichen Versuchen, Organe außerhalb des Spenders zu konservieren, d.h. vital und somit transplantationsbereit zu halten, wurden vor allem zwei, heute bereits verlassene Techniken angewandt:

1. **Die Organaufbewahrung in einem Zwischenwirt**: Diese nur experimentell zur Anwendung gelangte Methode bediente sich eines Zwischenwirtes der selben oder einer anderen Spezies (SLAPAK). Das aus dem Spender entnommene Organ wurde in einen Zwischenwirt transplantiert und dann nach Vorbereitung des definitiven Empfängers in diesen transferiert. Die zelluläre Immunität bei allogenen Zwischenwirten der selben Spezies und darüber hinaus die humorale Immunität bei xenogenen Zwischenwirten einer anderen Spezies limitieren verständlicherweise die Konservierungszeiten durch die drohende Abstoßung im Zwischenwirt und damit Zerstörung des Organs. Letale Ganzkörperbestrahlung des Zwischenwirtes (SELL) konnte die Konservierungsdauer wohl verlängern, die Methode hat sich aber trotzdem nicht durchgesetzt.
2. **Die normotherme Ex vivo- oder In vitro-Perfusion** des vom Spender isolierten Organs mit allogenem oder autogenem Blut unter Zuhilfenahme einer Herz-Lungen-Maschine. Diese Methode, die hervorragend für physiologische oder pathophysiologische Studien am isolierten Organ geeignet ist, kann nur kurzfristige Konservierungszeiten erzielen, da der Maschinenkreislauf eine der Perfusionszeit proportional zunehmende Traumatisierung der korpuskulären Perfusatelemente verursacht. Überdies tritt eine zunehmende Organschädigung bzw. Steigerung der vaskulären Organresistenz ein, was auf Mikroembolisierung aggregierter Perfusatelemente und auf Ödematisierung des Organs durch Gefäßpermeabilitätssteigerung zurückzuführen ist. Wir konnten in eigenen Versuchen zeigen, daß Lebern und Pankreaten vom Hund bzw. Schwein etwa 3 - 6 Stunden funktionsfähig bleiben, wenn sie mit xenogenem oder allogenem Blut normotherm durchströmt werden (BOECKL, ZIMMERMANN et al.).

Allgemein gesprochen muß eine Methode der Organkonservierung zum Ziele haben, das zu konservierende Organ durch adäquate Berücksichtigung der organspezifischen metabolischen Bedürfnisse vital zu halten: also ausreichende Sauerstoffzufuhr unter Vermeidung von Gewebshypoxie und Abtransport von Metaboliten.

1. **Dies kann einerseits durch genügende Oxygenierung in einem annähernd physiologischen Milieu erreicht werden**, wie dies bei der normothermen Perfusion mit Blut der Fall ist.
2. Die heute gängigen Methoden bedienen sich andererseits aber eines Tricks, indem sie

versuchen, **die metabolischen Bedürfnisse des zu konservierenden Organs zu reduzieren.** An erster Stelle steht hier die **Anwendung der Hypothermie**, im besonderen der hypothermen Perfusion. Man macht sich die Tatsache zu Nutze, daß die metabolischen Stoffwechselfunktionen linear mit fallender Temperatur abnehmen. Die Sauerstoffkonsumation sinkt sogar exponentiell ab. Bei unseren Versuchen liegt die Sauerstoffkonsumation hypotherm perfundierter Lebern bei + 10°C unter 10 % des Normalbedarfes, d.h. sie ist um mehr als 90 % reduziert. Daraus erklärt sich, daß die Ischämietoleranz eines Organs in reziproker Relation zur fallenden Temperatur zunimmt. Wir konnten nachweisen, daß Pankreas-Transplantate in Normothermie eine höchstens 4-stündige Ischämie tolerieren, bei Hypothermie von 4-8°C konnten 25-stündige Konservierungszeiten erzielt werden. Dies ist nach der Literatur, die ich überblicke, die längste Konservierungszeit beim Pankreas (HELL et al., ZIMMERMANN et al.).

Lebern zeigen eine nur 30- bis 40-minütige normotherme Ischämieverträglichkeit, hypotherm konservierte Organe konnten aber noch nach 24 Stunden erfolgreich transplantiert werden. Die längsten hypothermen Konservierungszeiten bei der Niere sind derzeit mit 72 Stunden limitiert, wie BELZER u.a. demonstrierten.

Bei der Diskussion der hypothermen Perfusion von Organen stellt sich die Frage, welche **Perfusionslösung** verwendet werden soll. Prinzipiell stehen einerseits Blut und andererseits azelluläre Perfusate zur Wahl; von den letzteren sind bisher Serum sowie isotonische oder leicht hypertone Elektrolytlösungen mit und ohne kolloidosmotischen Bestandteilen erprobt worden. Da der Erfolg der hypothermen Perfusion weitgehend von der Art des Perfusates abhängt, ist die Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte von Bedeutung:

1. Blut wird mit fallender Temperatur visköser.
2. Korpuskuläre Elemente zeigen die Tendenz zur Sedimentierung und können, vor allem bei tiefen Temperaturen, das Kapillargefäßbett des perfundierten Organs nach Art einer Mikroembolisierung verstopfen. Dies hat einen Anstieg der vaskulären Organresistenz zur Folge. Daraus wiederum resultieren ein verminderter Perfusionsflow, reduzierte Sauerstoffzufuhr, Gewebshypoxie, Gefäßwandpermeabilitätssteigerung mit Austritt von Perfusat in das Interstitium, was einen weiteren Anstieg der vaskulären Organresistenz infolge des Organödems bedingt, und schließlich irreversible Organschädigung.
3. Thermolabile Lipoproteine des Plasma präzipitieren in Hypothermie, was ebenfalls zur Steigerung der vaskulären Organresistenz und reduziertem Perfusionsflow führt.
4. Andererseits ist festzuhalten, daß die Sauerstoffkonsumation eines Organs in Hypothermie derart reduziert ist, daß es keiner hämoglobinhaltigen Erythrozyten im Perfusat bedarf, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, sondern daß der in einem azellulären Perfusat physikalisch gelöste Sauerstoff dazu ausreicht. Dazu kommt, daß die Konzentration des physikalisch gelösten Sauerstoffs mit fallender Temperatur zunimmt.
5. Elektrolytlösungen ohne kolloidosmotischen Bestandteilen führen durch Abwanderung in das Interstitium zu starker Ödembildung und Steigerung der vaskulären Organresistenz. Bewährt hat sich daher der Zusatz von 5 % Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von 40.000.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß in Hypothermie azelluläre Perfusate der Verwendung von Blut überlegen sind. Wir konnten dies an Hand der extrakorporalen Perfusion

von Lebern demonstrieren. Eine Gruppe von Organen wurde mit auf einen Hämatokrit von 15 % verdünntem autologen Blut, eine weitere Gruppe mit verdünntem homologen Serum perfundiert. Die Perfusionen, die bis zu 24 Stunden ausgedehnt wurden, erfolgten in Hypothermie, und zwar bei $+10^{\circ}\text{C}$. Der Perfusionsflow wurde auf 10 % des Normalwertes reduziert, und zwar von 1 ml/Gramm Leber/Minute auf 0,1 ml/g/Minute. Nach Beendigung der hypothermen Perfusion wurden die Lebern auf 37°C erwärmt und nun in Normothermie zum Zwecke der Ausführung von Funktionstests mit Blut durchströmt. In der Gruppe von Lebern, die mit Serum durchströmt worden waren, zeigten sich

1. nach Belastung des Perfusionssystems mit 100 mg Bromthalein eine höhere Exkretionsrate,
2. nach Belastung mit 1 g Natrium-Laktat ein stärkerer Laktat-Clearance und ein deutlich höherer Anstieg des Pyruvat- und alpha-Ketoglutaratspiegels im Perfusat,
3. höhere Galleflußraten als in der mit Blut durchströmten Gruppe von Lebern.
4. Darüberhinaus rangierte die Sauerstoffkonsumation in dem für In-vitro-Verhältnisse normalen Bereich von 0,02 - 0,03 ml/Gramm Leber/Minute, während sie in der Gruppe von mit Blut durchströmten Lebern wesentlich niedriger lag.
5. Die histologische Untersuchung der Lebern zeigte nach Blutperfusion in Hypothermie Zeichen der Stauung mit Dilatation der Zentralvenen bzw. Sinusoide, Hämorrhagien und Nekrosen im Läppchenbereich sowie Gefäßverschlüsse durch zerstörte Zellen bzw. Fibrin und ein deutliches Ödem. Bei den mit Serum durchströmten Lebern waren diese Befunde wesentlich schwächer ausgeprägt (HELL et al.).

Allgemein erwies sich bislang als bestes Perfusat für hypotherme Perfusionen homologes Plasma, dessen labile Lipoproteine durch vorangegangene Kältepräzipitation ausgefällt und mittels Filtration durch einen Mikrofilter eliminiert wurden. Daneben setzen sich aber mehr und mehr synthetische Perfusate durch, so etwa die Stammlösungen von Collins oder Largiadèr, Perfudex oder Fresenius-Lösung, welchen meist 5 % Dextran zugefügt ist. Die Claes'sche Albuminlösung enthält 4,5 % Humanalbumin. Kalium-Jonen sollen in einer über das physiologische Ausmaß reichenden Konzentration vorhanden sein, um den in Hypothermie verstärkt einsetzenden Verlust des intrazellulären Kaliums hintanzuhalten. Der Verlust des intrazellulären Kaliums ist temperaturabhängig, über den Mechanismus ist nichts Näheres bekannt. Glukose unterstützt den anaeroben Stoffwechsel, aus dem ein Organ während der Anoxie seinen Energiebedarf deckt. Von besonderer Wichtigkeit ist, daß der **Perfusat-pH** durch Zusatz von Puffern in physiologischen Bereichen gehalten wird.

Wahlweise werden verschiedene Substanzen beigelegt: **Penicillin, Heparin; Papaverin, Procain und Phenoxybenzamin zur Vasodilatation; Magnesiumsulfat und Mersalyl** wirken als Stoffwechselinhibitoren. Allerdings ist zu betonen, daß Stoffwechselinhibitoren in Kombination mit Hypothermie eine nur gering additive Wirkung besitzen. **Hydrocortison und Chlorpromazin** stabilisieren die lysosomale Membran. Dies ist in Hinblick darauf bedeutsam, daß Anoxie oder pH-Verschiebungen im extrazellulären Raum die Lysosomen schädigen können, was zu einem Austritt der digestiv wirksamen lysosomalen Enzyme und damit zur Autodigestion der Zelle führen kann. Das Perfusat soll eine **leichte Hyperosmolarität** aufweisen, da es sonst zur Abwanderung in das Interstitium mit Steigerung der vaskulären Organresistenz und Reduzierung des Flow kommt. 5 % Dextran oder Mannit vermögen die Ödembildung hintanzuhalten. Zu starke Hyperosmolarität führt zur Dehydra-

Hämoglobinfreie, aber O₂-bindende Lösungen, die als künstliches Blut bezeichnet werden, wie etwa eine Fluorokarbon-Emulsion, haben sich als Perfusat nicht durchsetzen können.

Von Wichtigkeit ist die Hämodynamik der hypothermen Perfusion. Infolge des geringen O₂-Bedarfs sind nur niedrige Flowraten erforderlich. Es kann zwischen einer der Herzaktion analogen pulsierenden und einer kontinuierlichen, nicht-pulsierenden Perfusion, wie sie bei einem Graviditätsflow gegeben ist, unterschieden werden. Bei der Perfusion der Niere in Normothermie ist der pulsierende dem nicht-pulsierenden Flow überlegen. Wie wir in eigenen Versuchen zeigen konnten, weist eine isolierte Leber, die gleichzeitig normotherm mit pulsierendem Flow über die A. hepatica und nicht-pulsierendem Flow über die V. portae durchströmt wurde, bessere Partialfunktionen und erhöhte Sauerstoffkonsumation auf als bei alleiniger nicht-pulsierender oder gar pulsierender Perfusion über die V. portae. Der signifikante Unterschied in der Sauerstoffkonsumation ist aber vom Blutfluß abhängig, d.h., nur bei normalen Durchflußraten von 1 ml/g Leber/Minute nachweisbar. Bei einem Flow unter 0,6 ml/g/Minute ist der Unterschied nicht mehr nachweisbar (BOECKL, HELL et al., ZIMMERMANN et al.).

Die in Normothermie feststellbare Abhängigkeit der Funktion des perfundierten Organes von der Hämodynamik der Perfusion ist in Hypothermie nicht so deutlich ausgeprägt. Dies bedeutet, daß auch eine nicht-pulsierende Durchströmung, etwa der Niere oder Leber, eine ausreichende Konservierung gewährleistet, obwohl einige Befunde darauf hindeuten, daß auch in Hypothermie der pulsierende Flow dem nicht-pulsierenden bei der Niere überlegen ist.

Für die Nierenkonservierung sind heute bereits Perfusionsmaschinen am Markt erhältlich. Die bekanntesten sind die **Maschine von Belzer und das transportable Perfusionssystem von Gambro**. Beim Menschen wurden bereits bis 72-stündig konservierte Nieren erfolgreich transplantiert.

Erfolgreiche Konservierung durch hypotherme Perfusion ist durch prompte Funktion nach Revaskularisation im Empfänger feststellbar. Nach 25-stündiger Konservierung und anschließender iliakaler Allotransplantation von Duodenopankreaten konnten wir wenige Minuten nach Revaskularisation die Duodenalperistaltik, exokrine Sekretion und Insulinausschüttung nachweisen (ZIMMERMANN). Bei Nieren tritt mitunter als Konservierungsfolge unmittelbar nach Transplantation eine passagere Phase der Oligurie bzw. Anurie auf, die auf eine akute tubuläre Nekrose zurückzuführen ist. Ist die Konservierungsschädigung nicht zu extensiv, so ist diese Niereninsuffizienz reversibel. Oftmals kann der Zeitraum durch Dialyse überbrückt werden.

Als Folge des Verlustes an intrazellulärem Kalium während der hypothermen Perfusion stieg in eigenen Versuchen an Pankreaten die Kaliumkonzentration im Perfusat signifikant an. Nach Revaskularisation der Organe in den Empfängern war im Empfängerblut als Ausdruck des Kalium-Uptake durch das transplantierte Organ eine signifikante Hypokaliämie unmittelbar post transplantationem nachweisbar. Bei Lebern konnten wir nach 1-stündiger hypothermer Anoxiezeit unmittelbar nach Revaskularisation deutliche Kaliumanstiege im Cavablut messen. Sie waren – ebenfalls als Ausdruck des erhöhten Uptake durch die Leber – von Hypokaliämien gefolgt. Bei ungenügender Konservierung der Leber

können nach Revaskularisation sogar letale Kaliummengen ausgeschwemmt werden. Wir haben mehrere Fälle mit Herzstillstand erlebt (ZIMMERMANN, HELL, BOECKL et al.).

Mehrfache Untersuchungen deuten darauf hin, daß der Gehalt an Adenosintriphosphorsäure ein guter Parameter der Funktion von Lebern und Nieren darstellt und als Kriterium für die Güte der Konservierung herangezogen werden kann. 1-stündige Ischämie erzeugt ein Absinken des ATP-Gehaltes der Leber auf 15 %, eine 2-stündige Ischämie auf 11 % des Normalwertes (NORMAN).

Wie bereits angedeutet, kann die Hypothermie zur Erzielung längerer Konservierungszeiten mit anderen Maßnahmen kombiniert werden. So wurde versucht, durch hypotherme Perfusion und Applikation von Stoffwechselinhibitoren, wie Chlorpromazin oder Mersalyl, bessere Resultate zu erzielen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Kombination nur einen geringen additiven Effekt besitzt.

Thiouracil reduziert die Sauerstoffkonsumation von Nierenhomogenaten um 90 % (REID). Rattenherzen ließen sich durch Magnesiumsulfat kurze Zeit bei Raumtemperatur konservieren (WEBB). Glukosezusatz zum Perfusat vermag anoxische Rattenherzen bis zu einem gewissen Grad zu konservieren (WEISSLER).

Interesse verdient die Kombination von Hypothermie mit sogenannter **hyperbarer Oxygenierung** (MANAX). Überdruck erhöht die Diffusion von Sauerstoff in das zu konservierende Organ. Die maximale Gewebsdicke, die durch Diffusion allein versorgt werden kann, beträgt bei 3 Atmosphären Druck und +4°C 5 mm. Die Methode hat sich aber auch bei voluminösen Organen bewährt, was darauf hindeutet, daß die Diffusion nicht nur via Kapsel, sondern auch via Gefäßbaum des Organs erfolgt. Hundenieren, in eine kalte Lösung eingetaucht und unter Überdruck aufbewahrt, konnten 24 Stunden erfolgreich konserviert werden; der Konservierungseffekt des hyperbaren Mediums ging verloren, wenn der Gefäßbaum zuerst abligiert wurde (NABSETH).

Mit der Methode wurden Hundelebern 25 Stunden und humane Lebern 7 1/2 Stunden erfolgreich konserviert und transplantiert (BRETTSCHEIDER, STARZL).

Pankreaten ließen sich durch hypotherme Perfusion mit Ringer' Laktat und hyperbarer Oxygenierung 24 Stunden vital erhalten (LILLEHEI). Bisher wurden vorwiegend Drucke bis zu 4 ata angewandt, da höhere Werte eine zu lange Dekompressionszeit benötigen, will man Gasembolien vermeiden.

Da der Effekt der hyperbaren Oxygenierung zum Teil auch durch Edelgase bei gleichem Druck erzielt werden kann, ist anzunehmen, daß weniger der Sauerstoff als solcher, sondern der Gasdruck die Verlängerung der Lebensfähigkeit konservierter Organe bedingt.

Heute ist man weitgehend von der hyperbaren Oxygenierung abgekommen, da die Verbesserung der Technik der hypothermen Perfusion größere Konservierungszeiten ermöglicht und zusätzliche Maßnahmen nur einen gering additiven Effekt besitzen.

Obwohl zur Konservierung von parenchymatösen Organen heute die hypotherme Perfusion bei 4 - 8°C mit azellulären Perfusaten und niedrigen Durchflußraten als effizienteste Technik generell zur Anwendung kommt, lastet ihr der Nachteil an, daß die bisher erzielte maximale Konservierungszeit von 72 Stunden bei der Niere nach aller Voraussicht kaum mehr wesentlich zu überschreiten ist und andererseits trotz größter Erfahrung und subtilster Technik des Chirurgen einzelne Versager nicht auszumerzen sind. Es passiert immer wieder, daß etwa eine Niere durch die Konservierung irreversibel geschädigt wird. Dies hat unter Um-

ständen **einerseits seine Ursache in der falschen Vorbereitung des Kadaverspenders**: so sind vasokonstriktorisch wirksame Kreislaufmittel strikt abzulehnen und auch Hypovolämien zu vermeiden, weil beide zu einer deletären Steigerung der Organresistenz und Outflow-block im Transplantat während der Perfusion und nach Transplantation führen können! Ein ausgewogenes Infusionsprogramm und die Erhaltung der Harnflußraten sind unbedingt indiziert.

Irreversible Transplantatschäden können aber andererseits auch durch die Konservierung selbst zustandekommen. Man hat sich daher die Frage gestellt, ob diese Schädigungen nicht dadurch zu vermeiden sind, daß man auf die Perfusion überhaupt verzichtet und das Organ lediglich in die konstant gekühlte Perfusionsflüssigkeit hineinlegt. Dazu ist festzustellen, daß bei diesem **"Simple Cooling"** auch auf die Vorteile der Perfusion verzichtet werden muß, die darin liegen, daß

1. das Organ durch die Perfusion rascher abgekühlt werden kann,
2. die Sauerstoffzufuhr infolge Perfusion wesentlich höher ist und bis an das Gewebe heranreicht,
3. der Abtransport von Metaboliten und verbrauchten Puffern gewährleistet ist,
4. Pharmaka, wie etwa Stoffwechsellinhibitoren, Vasodilantien, Membranstabilisatoren, Antikoagulantien oder Antibiotika, bis an das Gewebe und nicht nur bis an die Organ-kapsel herangebracht werden können, und schließlich
5. durch das Verhalten des Organs während der Perfusion – etwa vaskuläre Resistenz – auf den Konservierungszustand geschlossen werden kann.

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß durch "Simple Cooling" ebenfalls eine brauchbare Konservierungsmöglichkeit gegeben ist. Neuere experimentelle Daten weisen darauf hin, daß durch eine initiale hypotherme Perfusion mit anschließender einfacher Lagerung in Hypothermie bei der Niere Konservierungszeiten zu erzielen sind, die fast so lange wie bei durchgehender Perfusion sind.

Das definitive Ziel der Arbeiten auf dem Gebiet der Organkonservierung ist, wie eingangs aufgezeigt, die **Langzeitkonservierung über Wochen, Monate, ja Jahre**. Dies würde den Aufbau einer **Organbank** ähnlich der Blutbank oder – wie sie heute ebenfalls schon besteht – Hautbank ermöglichen.

Als wohl einzige Möglichkeit – soweit heute abschätzbar – bietet sich die Tiefgefrierung an.

Um diese Möglichkeit zu diskutieren, ist es notwendig, weiter auszuholen: seit über 200 Jahren besteht Interesse an der Biologie lebender Zellen bei tiefen und tiefsten Temperaturen. Die offizielle Eingliederung der sogenannten Kryobiologie als einen Zweig der Wissenschaften erfolgte aber erst im Jahre 1964 mit der Gründung der **Internationalen Gesellschaft für Kryobiologie**.

Der eigentliche Wendepunkt, mit dem das Überleben von Zellen nach Einfrierung und Wiederauftauung in den Bereich des Möglichen rückte, lag in den 40iger und 50iger Jahren, als LOVELOCK u. a. erstmals den **kälteschützenden Effekt von Glycerol und Dimethylsulfoxyd auf das lebende Protoplasma** erkannten. Wird ein lebendes Gewebe eingefroren, so kommt es zur intra- und interzellulären Eiskristallbildung. Die herkömmliche Auffassung schuldigte nun diese Kristallisation als mechanische Ursache für die Zerstörung und Zerreißung der Zellularstruktur beim Einfrieren an. Es war wiederum das Verdienst

von LOVELOCK erkannt zu haben, daß der schädliche Effekt des Einfrierens nur zum geringeren Teil auf die mechanische Zerstörung der Zell- und Gewebsstruktur durch die Eiskristallbildung zurückzuführen ist, sondern daß es infolge der Kristallisation, die sich über dem sogenannten eutektischen Punkt nur aus Wasser formiert, und dem damit verbundenen Wasserentzug aus dem Gewebe zur Störung der Isotonie im intra- und interzellulären Raum kommt. Mit anderen Worten, **zur Eiskristallbildung wird Wasser entzogen, woraus eine für die Zelle letale Gewebs-Hypertonie entsteht.**

Substanzen, wie vor allem Glyzerol und Dimethylsulfoxyd, sogenannte Kryophylaktika, sind nun imstande, infolge lockerer molekularer Bindung mit Wasser den im Rahmen der Eiskristallisation erfolgenden Wasserentzug zu hemmen. Die Folge davon ist einerseits eine Gefrierpunktniedrigung im Gewebsmilieu, andererseits eine Verminderung der intra- und interzellulären Eiskristallisation während des Einfrierens. So günstig der Effekt der Kryophylaktika auch sein mag, ihre Anwendbarkeit wird jedoch durch die Tatsache geschmälert, daß hohe Konzentrationen erforderlich sind, um die Zelle ausreichend zu schützen. So werden für Glyzerol 2-5 molare Lösungen als optimale Konzentrationen je nach Gewebeart angegeben. In diesen Konzentrationen wirken die genannten Pharmaka jedoch toxisch. Sie erzeugen per se eine Hyperosmolarität des Gewebes und setzen somit osmotische Schäden. Glyzerol hemmt also wohl in der Phase des Einfrierens die Gewebshypertonie, führt aber während des Auftauens in den kryophylaktisch wirksamen hohen Konzentrationen zur zellulären Ödembildung und Zerstörung. So wurde an reimplantierten Hunden, die mit einer 15 %igen Glyzerollösung perfundiert worden waren, ein deutlicher "Outflow-block" festgestellt (HALASZ, ORLOFF).

Die Forderung, die sich somit erhebt, ist, die Kryophylaktika in der Phase der Auftauung so rasch wie möglich aus dem lebenden Milieu zu entfernen. Dies ist im Falle von einzelnen Zellen durch Waschung oder im Falle eines Organs durch Perfusion mit verschiedenen konzentrierten Zuckerlösungen bis zu einem gewissen Grad möglich.

Basierend auf den genannten Erkenntnissen ist es bisher möglich gewesen, **einzelne Zellen – wie etwa Spermatozoen oder Blut, durch Einfrieren für mehrere Jahre zu konservieren**, anschließend aufzutauen und erfolgreich der entsprechenden Verwendung zuzuführen. So gelang es, Rinder mit bis zu 4 Jahre gefrierkonservierten Samenzellen zu befruchten. Im Falle von gefrorenem Blut ergeben sich die in Zukunft sicher sehr wertvollen Möglichkeiten einer **internationalen Blutbank**, um so etwa Blut mit seltenen Blutgruppen austauschen zu können.

Das grundsätzliche Problem bei ganzen Organen besteht aber darin, daß im Gegensatz zu einzelnen Zellen neben der zellulären Integrität auch die vaskuläre und Gewebsintegrität erhalten bleiben muß. Versuche, parenchymatöse Organe dem Gefrier-Tau-Zyklus zu unterwerfen, waren bisher fast ausschließlich erfolglos geblieben. Nieren, die verschiedene Zeiträume – etwa bei -70°C durch Kohlensäureschnee oder bei -156°C in flüssigem Stickstoff – konserviert wurden, zeigten nach Auftauung und Reimplantation eine beträchtliche, auf Zellödem zurückzuführende Volumszunahme und einen Outflow-block. Eine längerdauernde Funktion wurde vermißt.

Bisher wurden lediglich Ureter (BARNER), Dünndarm (HAMILTON, GUTTMANN) und Milz (BARNER) vom Hund erfolgreich gefrierkonserviert. Die Organe wiesen nach erfolgter Wiedererwärmung und Reimplantation alsbald eine normale Funktion auf und le-

diglich passager waren histologisch Inflammationserscheinungen festzustellen. Beim Dünndarm war neben der resorptiven Kapazität sogar die Peristaltik wiedergekehrt. Bezüglich des Gehirns sind nur In vitro-Versuche bekannt, bei welchen nach erfolgter Gefrierkonservierung und Wiedererwärmung Aktionsströme im EEG nachgewiesen werden konnten.

Wir selbst haben erstmals in der Literatur Gefrierkonservierungsversuche von Pankreas-Transplantaten am Hund ausgeführt und beobachten können, daß heterotop substitutiv allotransplantierte Pankreaten nach 1-wöchiger Gefrierkonservierung bei -70°C und anschließender Auftauung eine bis zu einem gewissen Grad erhaltene Funktionsfähigkeit aufwiesen. Glukosetoleranztests bei den Empfängern zeigten im Vergleich zu Kontrollgruppen, daß ein gewisser Glukoseclearance vorhanden war, wobei signifikant geringere Blutzuckerwerte als bei Tieren mit alleiniger Pankreatektomie – ohne Transplantat – gemessen wurden. Histologisch wiesen die Organe eine beträchtliche Gewebdissoziation auf. Während normothermer In vitro-Perfusion der gefrierkonservierten und wieder aufgetauten Pankreaten konnte an Hand verschiedener Parameter eine beträchtliche Funktionsstörung im Vergleich zu frischen Organen beobachtet werden: Zunahme der vaskulären Organresistenz infolge fortschreitender Ödematisierung, Outflow-block, massiver Amylase-Release aus dem Organ in das Perfusat, fehlende Stimulierbarkeit der exkretorischen Funktion durch Sekretin, Leakage von Perfusat in das exokrine Sekret infolge Kapillarwandschädigung im Organ und schließlich signifikant reduzierte Sauerstoffkonsumation mit einem mittleren Wert von 0,003 ml/Gramm Pankreas/Minute gegenüber 0,011 ml/g/Minute bei frischen Kontrollen (ZIMMERMANN, ZIMMERMANN u. DRAPANAS).

Es sei noch auf eine Serie von Versuchen hingewiesen, bei welchen wir **Kaninchenlebern über verschiedene Zeiträume – zwischen 3 Stunden und einem halben Jahr –**, bei -70°C **gefrierkonserviert** und anschließend nach einer etwa 15-minütigen Auftauungsperiode in vitro normotherm mit allogenen Blut zwecks Funktionstests perfundiert haben. Dabei ergaben sowohl die allgemeinen Parameter – wie Sauerstoffkonsumation und vaskuläre Organresistenz – als auch leberspezifische Tests – wie Enzymrelease, Galleproduktion und Exkretionstests – eine massive Konservierungsschädigung. Auf der anderen Seite konnte aber gezeigt werden, daß selbst nach einer halbjährigen Gefrierkonservierung noch eine gewisse metabolische Aktivität – wie Milchsäureclearance und Brenztraubensäure- sowie alpha-Ketoglutaräuresynthese – beobachtet werden konnte. Dies weist darauf hin, daß trotz Zerstörung der Leberstruktur für den Metabolismus notwendige Enzymsysteme erhalten geblieben waren (ZIMMERMANN u. DRAPANAS).

In diesem Zusammenhang muß eine **kritische Bemerkung über den Wert von Funktionstests während einer In vitro-Organperfusion zur Beurteilung eines Konservierungseffektes** gemacht werden. Die Funktionstests ergaben in unseren Versuchen wohl eine metabolische Aktivität und somit eine gewisse "Funktionsfähigkeit". Dies bedeutet aber lediglich, daß die katalytischen Systeme erhalten geblieben waren, über die Vitalität des Organs kann hingegen keine Aussage getroffen werden. Die einzige Methode, die imstande ist, die konservierte Vitalität zu beweisen, ist die lebenserhaltende substitutive Transplantation des Organs.

Interessant war in unseren Versuchen, daß sich kein signifikanter Unterschied in den Partialfunktionen der Lebern, die für 3 Stunden und jenen, die für ein halbes Jahr eingefroren wurden, fand. Dies weist darauf hin, daß nicht die Dauer der Tiefgefrierung, son-

dern der Gefrier- bzw. Tauprozess selbst als die hauptsächlich schädigenden Faktoren in Betracht kommen. Darüber hinaus konnten wir auch feststellen, daß beträchtliche Unterschiede in der protektiven Wirkung verschiedener Kryophylaktika bestehen: Glycerol und Dimethylsulfoxyd waren z.B. Äthylenglykol deutlich überlegen.

Die bisherigen Erfolge der Organkonservierung durch Tiefgefrierung sind sicherlich bescheiden, wenn nicht sogar entmutigend, was die parenchymatösen Organe betrifft. Allerdings legen die schönen Erfolge bei Dünndarm und Ureter nahe, daß die Methode prinzipiell gangbar sein müßte. Die gegenwärtig laufenden intensiven Arbeiten lassen hoffen, daß in der Zukunft noch Erfolge zu erwarten sind. Mögliche Ansatzpunkte für Fortschritte wären:

1. Effektivere Kryophylaktika,
2. Verbesserung des Gefrierprozesses, wie etwa ultraschnelles Einfrieren etc., und schließlich
3. Verbesserung des Auftauprozesses, wie etwa die Verwendung von Diathermie o. ä.

Zum Abschluß noch einige Bemerkungen, die die **Definition "Organkonservierung"** gegenüber gleich- oder ähnlichlautenden Begriffen abgrenzen soll.

Organkonservierung in dem bisher besprochenen Sinn heißt **Erhaltung der Vitalität** und damit auch der spezifischen und unspezifischen Funktionsfähigkeit des Organs.

Die nach erfolgter Konservierung vorgenommene **Vitalitätsprüfung** muß daher folgende Kriterien zum Objekt haben:

1. Nachweis der Integrität der Organstruktur in funktioneller und morphologischer Hinsicht: normale vaskuläre Organresistenz, keine wesentliche Gewichtszunahme, histologisch intakte Organstruktur u. ä.
2. Nachweis der metabolischen Aktivität des Organs: Sauerstoffkonsumation, CO₂-Produktion, Analyse verschiedener Stoffwechselvorgänge, wie etwa Milchsäureclearance u. ä. Der Nachweis ist vor allem durch In vitro-Perfusion zu erbringen.
3. Nachweis der spezifischen Organfunktionen: Gallesekretion, Farbstoffexkretion u. a. bei der Leber, Urinproduktion bei der Niere, rhythmische Aktionen beim Herzen oder Insulinsekretion beim Pankreas. Der Nachweis kann durch In vitro-Perfusion erbracht werden. Letztlich beweisend ist aber nur die lebenserhaltende Wirkung der substitutiven Transplantation der Organe.
4. Nachweis der erhaltenen Eigenheit lebenden Gewebes: Fähigkeit zur Zellteilung, Regenerationsfähigkeit etc. Der Nachweis kann durch Transplantation oder aber in der Gewebekultur erfolgen.

Es muß nochmals mit aller Entschiedenheit betont werden, daß fast alle In vitro-Tests irreführend sein können und daß, wie bereits erwähnt, der definitive Beweis einer erfolgreichen Organkonservierung nur durch den Organersatz in vivo erbracht werden kann.

Methoden, die Organe oder Organteile, wie Knochen oder Arterienstücke, zum Zwecke des auto- oder alloplastischen Ersatzes konservieren, erhalten nicht die Vitalität des Organs. Diese implantierten Organteile dienen lediglich dazu, die eigene Regenerationsfähigkeit des Organismus im Sinne einer Brücke, Stütze oder Schiene zu beeinflussen. Die Struktur des Implantates selbst wird oftmals resorbiert. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang auch die **Gefriertrocknung, Lyophilisation**. Diese Methode macht sich die Tatsache

zu Nutzen, daß bei tiefen Temperaturen, und zwar unter dem sogenannten Tripelpunkt, im Falle von Druckerniedrigung gefrorenes Wasser sublimiert, d.h. direkt unter Überspringen der flüssigen Phase in Dampf übergeht. Derart gefriergetrocknete Gewebe haben in der Medizin ihre oftmals segensreiche Anwendung gefunden. Dabei ist vor allem an die Verwendung lyophilisierter Haut bei Verbrennungen zu denken.

In einer sogenannten **Hautbank**, wie sie etwa die U.S.Navy besitzt, wird einerseits derartige **lyophilisierte Haut** gelagert; sie dient z.B. bei Verbrennungen quasi als natürlicher Schutzverband. Andererseits wird aber auch **vitale Haut hypotherm konserviert**. Sie kann als Allotransplantat bei Verbrennungen Anwendung finden und ist lyophilisierter Haut insofern überlegen, als es ja vor der Phase der Abstoßung zum echten Anwachsen mit Gefäßeinsprossung kommt. Wenn dieses Angehen der Allotransplantate auch nur passager ist, so sind sicherlich viele Verbrennungskranke dadurch gerettet worden. Die Anwendung kommt vor allem bei ausgedehnten Verbrennungen in Frage, wenn zu wenig eigene Haut zur Autotransplantation, die natürlich der Allotransplantation überlegen ist, zur Verfügung steht.

Die hypotherme Konservierung von Leichenhaut, die der späteren Anwendung als Allotransplantat dient, kann z.B. bei $+4^{\circ}\text{C}$ erfolgen. Die Haut wird so zusammengefaltet, daß die Wundflächen aufeinanderliegen. Sie bleibt bis zu 3 Wochen gebrauchsfähig. In Normothermie kann Haut, in Serum gelagert, nur bis etwa 48 Stunden vital erhalten werden.

Die Zukunft wird weisen, ob die Fortschritte auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie und der Organkonservierung miteinander Schritt halten können. Dies wäre zu wünschen, da beide voneinander abhängen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die zunehmenden Erfolge der Organtransplantation bedingen auch einen zunehmenden Bedarf an geeigneten Methoden der Organkonservierung. Bis jetzt ist es durch hypotherme Perfusion oder Lagerung in einem gekühlten Medium möglich, Organe über kurze Zeiträume erfolgreich zu konservieren. Für die Zukunft eröffnet sich die Möglichkeit der Langzeitkonservierung durch Tiefgefrierung, wodurch sogenannte Organbanken errichtet werden könnten.

SUMMARY

The increasing success in organ transplantation is followed by an increasing need for reliable methods of organ preservation. Up to date hypothermic perfusion or simple cooling of organs are able to preserve organs for short periods of time. For the future freezing storage of organs offers the possibility of long term preservation in an organ bank.

Literatur beim Verfasser.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereinigung in Salzburg](#)

Jahr/Year: 1976

Band/Volume: [2](#)

Autor(en)/Author(s): Zimmermann G.

Artikel/Article: [MÖGLICHKEITEN DER KONSERVIERUNG VON ORGANEN ZUM ZWECKE DER TRANSPLANTATION. 137-147](#)