

Aus der Klinik für Allgemein-,
Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Flüssigkeits- und Massenverteilung in
einem dreidimensionalen Hohlfasermembransystem
zur extrakorporalen Leberunterstützung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Kaspar

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. Neuhaus
2. Prof. Dr.-Ing. E. Heinzle
3. Priv.-Doz. Dr. med. K. H. Fey

Datum der Promotion: 23.09.2007

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	9
1.1 Einführung	9
1.2 Die Leber	10
1.2.1 Struktureller Aufbau der Leber	10
1.2.2 Mikroskopische Anatomie	11
1.2.3 Gefäßversorgung	11
1.3 Funktionen der Leber	13
1.3.1 Synthese / Biotransformation	13
1.3.2 Regulation des Säure-Basen-Haushalts	14
1.3.3 Immunsystem	14
1.3.4 Speicher	15
1.4 Regenerationsfähigkeit der Leber	15
1.5 Das Leberversagen	16
1.5.1 Allgemein	16
1.5.2 Das akute Leberversagen (ALV)	17
1.6 Therapieoptionen	19
1.7 Bisherige Lösungsansätze für <i>ex vivo</i> Systeme	21
1.7.1 <i>Ex vivo</i> Leberperfusion	21
1.7.2 Physikalische / Nicht-biologische Systeme	22
1.7.3 Biologische Systeme	25
1.8 Anforderungen an das LUS-Design	32
1.9 Ziel der Arbeit	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Bauteile des Bioreaktors	35
2.1.1 Der Reaktor	35
2.1.2 Das Gehäuse	38
2.1.3 Die Monitore	39
2.2 Die Laufmodi	40

2.3	Versuchsprotokoll.....	43
2.4	Untersuchte Reaktoren	44
2.5	Auswertung der Proben	45
2.6	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Allgemeine Beschreibung	47
3.2	Vergleich der Laufmodi bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten.....	48
	Mischzeiten bis zum Erreichen einer Homogenität von $h \leq 0,1$ im zellbefüllten Reaktor (H35)	67
4	Diskussion	68
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung	68
4.1.1	Durchmischungsversuche.....	68
4.1.2	Bolus-Applikation und Probengewinnung	69
4.1.3	Homogenität.....	71
4.1.4	Indikator	71
4.1.5	Vergleichbarkeit isotoner Kochsalzlösung mit Plasma	72
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	73
4.2.1	Allgemeine Grundlagen aus der Strömungslehre	73
4.3	Diskussion der Hypothesen	79
4.3.1	Empfehlung zur idealen Einstellung.....	81
4.4	Vergleich zu anderen Studien	82
4.5	Ausblick.....	84
5	Literaturverzeichnis	86
6	Zusammenfassung	95
7	Summary.....	96
	Danksagung und Widmung.....	97
	Lebenslauf	98
	Eidesstattliche Selbständigkeitserklärung	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mars Membran mit konischen Öffnungen zur Dialysat (Albumin) Seite hin (modifiziert nach Kapoor et al. ⁷⁴).	24
Abb. 2: Gesamtaufbau des Bioreaktor Systems mit Patienten- und Reaktormonitor.	34
Abb. 3: Schematische Darstellung des Systems am Patienten mit der Möglichkeit, ein Dialysem modul und ein Detoxifikationsmodul zu integrieren.	35
Abb. 4: Reaktoraufriß (technische Zeichnung)	36
Abb. 5: Der Bioreaktor ohne konnektierende Schläuche von schräg oben betrachtet.	36
Abb. 6: Aufriss des Bioreaktors und vergrößerter Anschnitt der Kapillarbündel.	37
Abb. 7: Perfusionsmodus	40
Abb. 8: Diffusion 1 Modus	41
Abb. 9: Diffusion 1 & 2 Modus	41
Abb. 10: Cross Flow Modus	42
Abb. 11: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 50 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 12:53 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 10:24 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 37:16 min., Cross Flow = 34:17 min.	48
Abb. 12: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 75 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 09:10 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 10:53 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 09:00 min., Cross Flow = 08:14 min.	50
Abb. 13: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 100 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 08:00 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 08:36 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 07:00 min., Cross Flow = 06:45 min.	52
Abb. 14: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 150 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 05:30 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 05:48 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 06:00 min., Cross Flow = 04:30 min.	54
Abb. 15: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 200 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 07:12 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 09:15 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 03:21 min., Cross Flow = 03:00 min.	56
Abb. 16: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 250 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 07:00 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 08:16 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 02:53 min., Cross Flow = 2:40 min.	58
Abb. 17: Durchmischungsdiagramm für die Flussrate 300 ml/min (Mediane, gestrichelte Linie = 100%). Mischzeiten: Perfusion = 03:40 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 08:00 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 02:18 min., Cross Flow = 02:53 min.	60
Abb. 18: Mischzeiten der Messungen in den zellfreien Reaktoren	62
Abb. 19: Durchmischungsdiagramm „zellbefüllt“ (H35, gestrichelte Linie = 100%) für die Flussrate 50 ml/min. Mischzeiten: Perfusion = 36:40 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 18:00 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 23:20 min.	64

Abb. 20: Durchmischungsdiagramm „zellbefüllt“ (H35, gestrichelte Linie = 100%) für die Flussrate 200 ml/min. Mischzeiten: Perfusion = 06:36 min., Diffusion (ein Kapillarbündel) = 23:38 min., Diffusion (beide Kapillarbündel) = 08:10 min.	65
Abb. 21: Mischzeiten im zellbefüllten Reaktor (H35)	67
Abb. 22: Molekulare Struktur von PSP.....	71
Abb. 23: Laminares Geschwindigkeitsprofil und Formel für die axiale Geschwindigkeitskomponente $u(r)$ (nach R. Wille ¹¹⁷)	74

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gradeinteilung der hepatischen Enzephalopathie ^{10, 49}	18
Tab. 2: Einteilung einer Bewusstseinsstörung nach der Glasgow-Komaskala ⁵²	19
Tab. 3: Physikalische / Nicht-biologische Systeme zur Therapie des ALV	23
Tab. 4: Übersicht über einige bisher am Patienten getestete hybride Leberunterstützungssysteme, in Anlehnung an van de Kerkhove ⁹	31
Tab. 5: Relativen Molekülmassen und Funktionen einiger wichtiger Plasma-Moleküle ¹⁰⁶	37

Abkürzungsverzeichnis

τ	Schubspannung
\dot{n}	Stoffstromdichte
\dot{q}	Wärmestromdichte
%	Prozent
ρ	Dichte
°	Grad
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
A	Fläche
A. (Aa.)	Arteria (Arteriae)
Abb.	Abbildung
A_{ges}	Gesamtquerschnitt
ALT	Alanin- Aminotransferase
ALV	akutes Leberversagen
AOC	acute-on-chronic
AOCHF	acute-on-chronic hepatic failure
AST	Aspartat-Aminotransferase
BAL	Bioartificial Liver
BLSS	Bioartificial Liver Support System
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
cBili	gebundenes Bilirubin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
d.h.	das heißt
d_{ak}	Außendurchmesser der Kapillare
dc/dx	Konzentrationsgradient
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
Diff	Diffusion durch ein Kapillarbündel
Diff 1&2	Diffusion durch beide Kapillarbündel
d_{ik}	Innendurchmesser der Kapillare
dT/dx	Temperaturgradient
dv_x/dy	Geschwindigkeitsquergradient
EEG	Elektroenzephalogramm
ELAD	Extracorporeal Liver Assist Device

etc.	et cetera
FHF	fulminant hepatic failure
g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
h	Homogenität
h	Stunde(n)
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HDL	high-density lipoproteins
Hg	Quecksilber
Ig	Immunglobulin
K	Filtrationskoeffizient
kD	Kilo-Dalton
L	Liter
LDL	low-density lipoproteins
Lig.	Ligamentum
l_{ik}	Länge der Kapillare im Reaktorinnenraum
l_k	Länge der Kapillare
LTX	Lebertransplantation
LUS	Leberunterstützungssystem
M.	Morbus
m^2	Quadratmeter
m^3	Kubikmeter
MARS	Molekulare Adsorbentien Rezirkulierendes System
MELS	Modular Extracorporeal Liver Support
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPS	monozytäres Phagozytosesystem
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n_k	Anzahl der Kapillaren
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OLTx	orthotope Lebertransplantation
p	Druck
p	piko
Perf	Perfusion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

p_{IF}	Hydrostatischer Druck im extrakapillären Raum
p_{Kap}	Hydrostatischer Druck in den Kapillaren
PNF	primary non function
PSP	Phenolsulfonphtalein (Phenolrot)
PUR	Polyurethan
PVC	Polyvinylchlorid
Re	Reynoldszahl
RFB	Radial Flow Bioreactor
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
s	Sekunde
sek.	Sekunde
s_K	Wandstärke der Kapillare
sog.	so genannt(en)
STH	somatotropes Hormon
t	Zeit
Tab.	Tabelle
tBili	totales Bilirubin
u.a.	unter anderem
v	Geschwindigkeit
V	Volumenstrom
V. (Vv.)	Vena (Venae)
V_{GS}	Gesamtvolumen aller Kapillaren im Reaktorinnenraum
V_{iOxy}	intrakapillare Volumen der Oxygenierungskapillaren
V_{iVers}	intrakapillare Volumen der Versorgungskapillaren
V_{Oxy}	Volumen der Oxygenierungskapillaren
vs.	versus
V_{Vers}	Volumen der Versorgungskapillaren
V_Z	Zellkompartimentvolumen
z.B.	zum Beispiel
η	dynamische Viskosität
η_0	Viskosität des Lösungsmittels
η_r	mittlere relative Viskosität
λ	Wärmeleitkoeffizient
μm	Mikrometer
v	kinematische Viskosität
v_K	mittlere Geschwindigkeit in den Kapillaren
π_{IF}	Kolloidosmotischer Druck im extrakapillären Raum
π_{Kap}	Kolloidosmotischer Druck in den Kapillaren

6 Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der Flüssigkeits- bzw. Massenverteilung in einem dreidimensionalen Hohlfasermembransystem zur extrakorporalen Leberunterstützung. Das Ziel der Arbeit ist der Vergleich von verschiedenen Laufmodi (Perfusion, Diffusion durch ein oder beide Kapillarbündel und Cross Flow) bei unterschiedlichen Flussraten (50 – 300 ml/min) zum besseren Verständnis der Durchmischungsvorgänge im Bioreaktor. Die Durchmischungsverhältnisse beeinflussen sowohl die Versorgung der im Bioreaktor kultivierten Zellen, als auch den Stoffaustausch mit dem Patienten. Sie sind somit ein wesentlicher Faktor der Funktion bzw. der Wirksamkeit eines solchen Bioreaktors. Soweit möglich, sollte eine Empfehlung für eine ideale Einstellung des Laufmodus in Kombination mit der Flussrate im Betrieb erarbeitet werden.

Zur Untersuchung der Flüssigkeits- und Massenverteilung im Bioreaktor wurden Durchmischungsmessungen mit Phenolrot (PSP) als Marker durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Messungen wurden die jeweiligen Mischzeiten bis zum Erreichen einer Homogenität von $h \leq 0,1$ errechnet.

Die Ergebnisse zeigten kürzere Mischzeiten bei Diffusion durch beide Kapillarbündel und beim Cross Flow, sowie bei höheren Flussraten. Der Cross Flow zeigte dabei ausgeglichene Kurvenverläufe. Die Perfusion zeigte insgesamt etwas längere Mischzeiten und einen bimodalen Verlauf der Mischzeiten, konnte aber auch noch gute Werte erreichen. Die Diffusion durch ein Kapillarbündel zeigte die längsten Mischzeiten, sowie ebenfalls einen bimodalen Verlauf der Mischzeiten. Relativ starke initiale Peaks lassen die Diffusion durch ein Kapillarbündel zusätzlich als am ungünstigsten erscheinen. Im Vergleich zu anderen beschriebenen extrakorporalen LUS ergab sich für das System eine insgesamt effektive Flüssigkeits- und Massenverteilung im Reaktor.

Unter Berücksichtigung der physiologischen Strömungsverhältnisse in der Leber, dem Bedarf an einem möglichst hohen Fluidumsatz, der Forderung nach einer möglichst schnellen Durchmischung ohne ein Ablösen der Zellen von ihrem Untergrund und den durch „membrane-fouling“ ausgelösten Prozessen erscheint der Cross Flow bei etwa 200 ml/min die geeignetste Einstellung für den Laufmodus und die Flussrate. Die Diffusion durch beide Kapillarbündel ist eine ebenfalls zufrieden stellende Alternative.

7 Summary

Fluid distribution and mass transfer in a three-dimensional holo-fiber-membrane system using Phenolsulfonphtalein

The objective of this work was to investigate the fluid distribution as well as the mass transfer in a three-dimensional (3D) hollow fiber membrane based bioreactor for extracorporeal liver support. The aim of the study was to compare the different distribution modes (perfusion, diffusion through either one or two capillary bundles, and cross-flow operation of two bundles) and different flow rates (50 – 300 ml/min), to improve the understanding of the mixing processes inside the system. The mixing ratio affects both the cell support as well as the mass transfer with the patient, and therefore is a significant factor of the function and the effectiveness of the bioreactor.

Investigations on the fluid distribution and mass transfer in the bioreactor were performed by measuring the distribution of phenolsulfonphtalein (PSP). The results were used to calculate the mixing times to homogeneity of $h \leq 0.1$.

The bioreactor exhibited shorter mixing times for the cross-flow - and diffusion mode through both capillary bundles and for higher flow rates. The cross-flow mode operation exhibited the most consistent progression of the concentration graphs. Perfusion showed longer mixing times and bimodal progression. Diffusion through one capillary bundle exhibited the longest mixing times and bimodal progression. Including the strong initial peaks, this mode appears to be least favorable. Compared to other published extracorporeal LSS, our system exhibited effective fluid distribution and mass transfer inside the bioreactor.

Considering physiological velocities in the liver, the need for high volume turnover, the demand for potentially rapid distribution without cell detachment, and processes induced by membrane fouling, the cross-flow mode appears to be the most favorable setting at a low flow rate of approximately 200ml/min. Diffusion through both capillary bundles presents a satisfying alternative.

Danksagung und Widmung

Herr Prof. Dr. Peter Neuhaus und Herr Prof. Dr. Dr. Jörg Gerlach danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und deren Begutachtung. Herr Prof. Dr. Dr. Jörg Gerlach danke ich zudem für die Vergabe des Themas, die Forschungsmöglichkeiten in der Charité, seine jahrelange Unterstützung und die vielen Anregungen, die Korrekturarbeit und seine Geduld beim Zusammenschreiben der vorliegenden Dissertation.

Frau Dr. Grit Kasper und Frau Dr. Hanna Schell danke ich für ihre kritischen und ihre motivierenden Kritiken und für die Hilfe bei meinem persönlichen Kampf mit den Kommata.

Bei meinen Mitdoktorantinnen und ~doktoranten und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie bedanke ich mich für die nette und konstruktive Arbeitsatmosphäre. Bei Herr Tom Witascheck bedanke ich mich insbesondere für die Überlassung der Laufmodus Grafiken.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, danke ich für die Unterstützung und Liebe die ich jederzeit von ihnen erfahren habe.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Selbständigkeitserklärung

Ich, Katharina Kaspar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Flüssigkeits- und Massenverteilung in einem dreidimensionalen Hohlfasermembransystem zur extrakorporalen Leberunterstützung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht ist sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin vom 08. Juni 2005 ist mir bekannt.

Die Promotion wurde mit Fördermitteln der DFG, dem BMBF und der Europäischen Union durchgeführt.

Berlin, den 07. November 2006

.....

Katharina Kaspar