
4 Diskussion

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Durchmischungsversuche

Durchmischungsversuche mit Farbstoffen gehören in der Strömungslehre und (Bio-) Prozesstechnologie zu den gängigen Verfahren. Physikalisch-chemische Reaktionen werden hierbei unterschiedlich genutzt. Üblich sind so genannte Entfärbungsmethoden oder Schlierenmethoden.

Bei den Entfärbungsmethoden wird zunächst ein farbiger Indikator homogen im zu untersuchenden System verteilt. In einem zweiten Schritt wird eine kleine Menge eines Tracers (Säure oder Lauge) hinzugefügt, welcher einen Farbumschlag verursacht. Diese Methode eignet sich besonders für durchsichtige Gefäße, da ein Farbumschlag, z.B. zu farblos, leicht optisch detektierbar ist ¹¹¹.

Bei den Schlierenmethoden wird dem System eine Flüssigkeit mit einem zur ursprünglichen Füllung unterschiedlichen Brechungsindex zugefügt. Das Verschwinden der Schlieren bzw. von Konzentrationsspitzen zeigt eine fortschreitende Durchmischung an ¹¹¹.

Andere Methoden nutzen Veränderungen physikalischer Größen wie z.B. der Temperatur, der Leitfähigkeit oder des pH-Wertes. Die Indikatoren werden meist durch eine im System installierte Sonde gemessen. Diese Methoden eignen sich, im Gegensatz zu den Methoden mit Farbstoffen, auch für undurchsichtige Systeme.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen wurde eine Schlierenmethode gewählt. Die Durchmischung lässt sich, anhand der Konzentrationsänderungen, in ihrem Verlauf gut darstellen. Die intensive Farbe des PSP ist selbst durch die gelbe Farbe des Reaktorgehäuses hindurch gut erkennbar. An einigen exponierten Stellen des Reaktors, wie z.B. den Kappen, lässt sich die Verteilung daher direkt beobachten. Mögliche Toträume in den Kappen oder am Rand des Reaktorgehäuses lassen sich, wenn auch nur subjektiv, beurteilen oder zumindest erkennen.

Eine Entmischungsmethode würde keine gleichwertige Verlaufsdarstellung ermöglichen. Pfaff et al. konnten bei Untersuchungen zur mittleren Verweildauer am hier untersuchten Bioreaktor zeigen, dass die Verwendung einer Entfärbungsmethode bis zu 30 min. länger bis zum Erreichen einer endgültigen Ent-/Durchmischung braucht als die Schlierenmethode¹¹². Gegen die Entmischungsmethode spricht desweiteren, dass verbleibende Schlieren auf Grund der Eigenfarbe des Reaktorgehäuses schwer erkennbar wären. Die Verwendung einer Säure oder Lauge als Tracer würde zudem die Frage aufwerfen, ob das System (z.B. die Kapillaren und eventuelle Zellen) durch die anfangs hohe Konzentration nach wiederholten Versuchen geschädigt wird. Insbesondere der Einflussbereich der Kapillarbündel, welcher für die Strömungsverhältnisse im System maßgeblich mitverantwortlich ist, wäre den höchsten Konzentration an Säure / Lauge und somit der größten Gefahr einer Veränderung im Verlauf der Messungen ausgesetzt. Bei der Auswertung der Daten ergäben sich mit der Entmischungsmethode weitere Probleme. Die Reaktoren haben nie das exakt selbe Volumen. Auch lassen sich kleine Differenzen von den jeweils applizierten Bolus-Volumina nicht ausschließen. Hinzu kommt, dass über den Versuchsverlauf unterschiedliche PSP-Chargen verwendet werden mussten, da die erste nicht ausreichte. Durch die Wahl eines farbigen Indikators lässt sich die Endkonzentration als vollständige Durchmischung annehmen. Die Konzentrationswerte im Verlauf der Messung können relativ auf den jeweiligen Endwert bezogen werden, so dass eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen untereinander entsteht. Bei einer Entmischung wäre der Endwert immer gleich dem einer isotonischen Kochsalzlösung. Ein Bezug der übrigen Werte einer Messung hierauf wäre nicht sinnvoll. Ein Bezug der Messwerte auf die Ausgangskonzentration würde Ungenauigkeiten bei den Tracer-Volumina nicht berücksichtigen. Ein Vergleich der unterschiedlichen Messungen, insbesondere bei unterschiedlichen Reaktoren, wäre eine unnötige und schwer abzuschätzende Fehlerquelle. Die Messung mittels einer Sonde hätte, insbesondere in der Initialphase, die Möglichkeit weiterer Messzeitpunkte eröffnet und Fehler beim Abnahmezeitpunkt minimiert. Denkbar wäre z.B. eine Veränderung der Leitfähigkeit durch die Applikation hochprozentiger Kochsalzlösung. Die möglicherweise größere Genauigkeit der Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Untersuchungen als nicht verhältnismäßig zum deutlich höheren technischen und finanziellen Aufwand gegenüber der gewählten Methode, sowie dem zusätzlichen Bedarf an Farbuntersuchungen der Strömung im Kappenbereich, gewertet.

4.1.2 Bolus-Applikation und Probengewinnung

Der Ort der Applikation des Indikators und der Ort der Probenentnahme können die Ergebnisse einer Durchmischungsuntersuchung beeinflussen. Die Entnahme der Proben über eine Sonde

aus dem Inneren des Reaktors würde z.B. lokale Werte für diesen speziellen Punkt ergeben. Diese müssen aber nicht unbedingt mit dem Zustand des gesamten Systems übereinstimmen. Der hier gewählte Applikations- und Entnahme-Ort dient im Stand-By- und im Therapiebetrieb ebenfalls zur Applikation, z.B. von Medikamenten und zur Probengewinnung. Es handelt sich dabei um ein rechtwinklig abzweigendes Schlauchende in der zuführenden Leitung zwischen den Rollerpumpen und dem Reaktor. Hinter dieser Abzweigung folgt im Reaktorkreislauf eine Blasenfalle, bevor sich die Leitung aufteilt und zu den zwei Einlaufkappen führt. Das PSP durchläuft so denselben Weg wie es das Nährmedium bzw. das Patientenplasma tun würde, und die entnommenen Proben geben den Zustand der Flüssigkeit wieder, welche im Therapiemodus in den Patientenkreislauf rezirkuliert würde. Durch das Abklemmen des Schlauchs vor der Applikationsstelle wird ein Durchmischen der Probe vor dem Start der Messung verhindert und so der Einfluss des Applikationsvorgangs auf die Ergebnisse minimiert. Das abzweigende Schlauchende hat eine Länge von ca. 4 cm und einen Innendurchmesser von 2,5 mm, so dass sich in ihm ein Totvolumen von maximal 0,25 ml ergibt. Verschlussen wird es mit einem Kombi-Verschlusskonus und einer Schlauchklemme zur Sicherung. Praktisch verringert diese Schlauchklemme das Totvolumen im Schlauchstück noch weiter. Die Differenz kann durch eine schief sitzende Klemme oder durch ein unterschiedlich starkes Verschließen der Klemme jedoch variieren, so dass hier ein Totvolumen von 0,25 ml angenommen werden soll.

Bei der Gewinnung der Proben wurde jeweils so vorgegangen, dass das Totvolumen im Schlauch direkt vor der Probenentnahme aspiriert wurde. Dieses Aspirieren lag ca. 5 sek. vor der eigentlichen Probenentnahme, jedoch nie länger als maximal 10 sek. vor dem Messpunkt. Die Proben wurden möglichst direkt im Anschluss und exakt zur vollen Minute entnommen. Trotz aller Sorgfalt muss hier mit einem Abweichen des tatsächlichen Entnahmezeitpunktes gegenüber dem geplanten von bis zu ± 2 sek. gerechnet werden. Das entspricht während der 60-Sekunden-Intervalle einer Ungenauigkeit von ± 3 %. Bei einem Probenvolumen von 1,5 ml beträgt die maximale „Verunreinigung“ durch das 0,25 ml Totvolumen 17 %. Da das in die Probe gelangende Totvolumen aber unmittelbar vor dem eigentlichen Messzeitpunkt aspiriert wurde, relativiert sich dieser Fehler. Bei einem Aspirieren des Totvolumens 10 sek. vor dem Messzeitpunkt, also der maximalen Zeitspanne, würde das die Probe verunreinigende Fluid selber einem Fehler von 17 % unterliegen. Insgesamt ergibt sich somit ein Fehler durch das mitaspirierte Totvolumen von ca. 3 % ($0,17 \times 0,17 = 0,0289$). Sämtliche Fehlerquellen wurden eher konservativ angenommen, bzw. jeweils aufgerundet. Aus dem maximalen zeitlichen Fehler und den maximalen Fehler aufgrund des Totvolumens, ergibt sich ein maximaler Gesamtfehler von ± 9 %. Durch das initiale Hin-und-her Aspirieren zum Entfernen von PSP Resten aus dem Schlauchende kann der erste Messwert möglicherweise beeinflusst werden. Dieser Einfluss

lässt sich jedoch nicht quantifizieren. Bei zunehmenden Messintervallen nimmt demnach der Gesamtfehler ab.

4.1.3 Homogenität

Die hier als Ziel gewählte Homogenität von $h \leq 0,1$ bedeutet, dass ein Abweichen der aktuell erreichten Konzentration um 10 % von der nach unendlicher Zeit erreichten Konzentration toleriert wird. Da im Rahmen dieser Versuchsreihe keine unendliche Zeitspanne zur Verfügung stand wurden die nach 60 Minuten (bzw. zweimal nach 30 Minuten) gemessenen Konzentrationen jeweils als endgültige Durchmischung angenommen und die übrigen Werte wurden darauf bezogen. Dies entspricht den Untersuchungen von Catapano et al. ¹¹³, welche ebenfalls eine vollständige Durchmischung nach 60 Minuten zeigten.

Mit einer Toleranz von $\pm 10\%$ liegt die angestrebte Homogenität außerhalb des unter 4.1.2 errechneten maximalen Fehlers von $\pm 6\%$.

4.1.4 Indikator

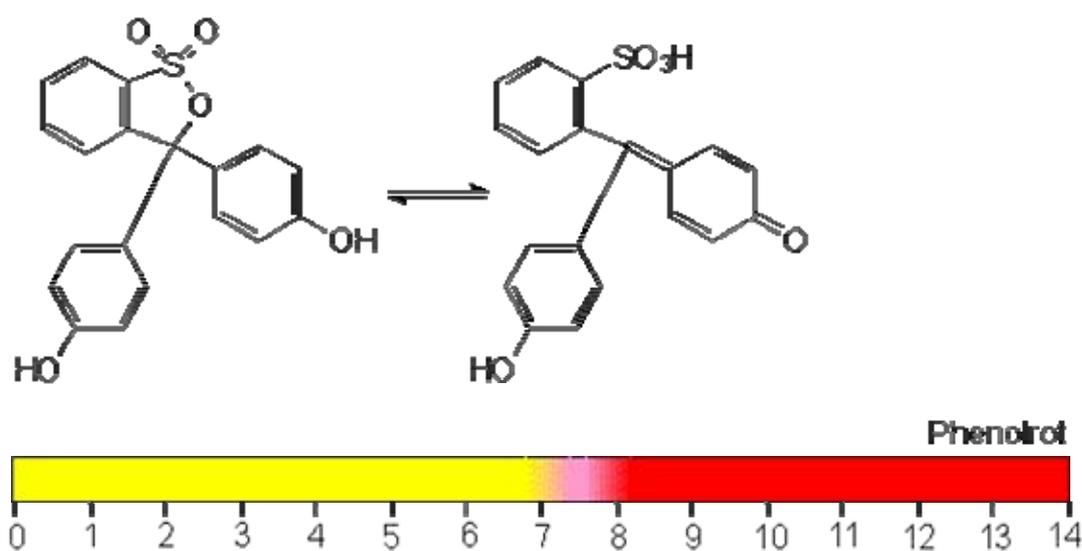


Abb. 22: Molekulare Struktur von PSP.

Beim Phenolrot (Phenolsulfonphthalein, 4,4-(3H-2,1-Benzoxathiol-3-yliden)bisphenol-1,1-dioxid) ist die CO-Gruppe des Phenolphthaleins durch eine SO_2 -Gruppe ersetzt. Als Indikator zeigt Phenolrot einen Farbumschlag bei pH 6,4-8,2 von gelb nach rot ¹¹⁴.

Phenolsulfonphthalein (4,4-(3H-2,1-Benzoxathiol-3-yliden)bisphenol-1,1-dioxid, Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$, Kurzform: PSP) ist ein ungiftiger und ökologisch weitgehend unbedenklicher Stoff der Wassergefährdungsklasse 1 (schwach Wassergefährdende Stoffe) ¹¹⁵. Es ist im medizinischen Bereich z.B. zur Nierenfunktionsprüfung zugelassen und in verschiedenen

Impfstoffen enthalten. Die Zellen im Reaktor (H35) werden durch das PSP somit nicht beeinflusst. PSP hat eine Molmasse von 354,38 g/mol¹¹⁵, entsprechend einer Molekülmasse von 354,38 Da, und kann die Membranen problemlos passieren. Verglichen mit Plasma-Molekülen wie Albumin (66,5 kDa), Fibrinogen (341 kDa) oder Immunglobulinen (150-900 kDa) ist PSP deutlich kleiner, wodurch sich die Membranpassage vereinfacht. In Wasser sind die Moleküle bei 20°C weitestgehend stabil. Der Farbumschlag findet bei einem pH = 6,4 – 8,2 von gelb nach rot statt^{114, 115}. Die sehr intensive Farbe bietet wie bereits beschrieben die Möglichkeit, durch die Reaktorhülle hindurch die Verteilung an exponierten Stellen zu beobachten. Mit Hilfe der Titration der Proben mit NaOH lässt sich eine vollständige Hydroxylierung, also ein kompletter Farbumschlag nach rot, sicherstellen. Mit einem Photometer ist PSP bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ ¹¹⁶ ein problemlos zu messender Indikator.

4.1.5 Vergleichbarkeit isotoner Kochsalzlösung mit Plasma

Bei den hier betrachteten Flüssigkeiten handelt es sich um sog. Newton Fluide. Ein Newton Fluid ist definiert als ein Kontinuum, welches in Ruhe keine

$$\text{Schubspannung } \tau = \eta \cdot \frac{dv_x}{dy} = \rho \cdot \nu \cdot \frac{dv_x}{dy}$$

aber eine Normalspannung p (\equiv Druck) aufnehmen kann¹¹⁷. η bezeichnet dabei die dynamische Viskosität (= Zähflüssigkeit) mit der Einheit [N·s/m²]. Der Zusatz „dynamisch“ bezieht sich dabei auf die enthaltene Kraftkomponente. dv_x/dy ist der Geschwindigkeitsquergradient mit der Einheit [s⁻¹]. ρ ist die Dichte [kg/m³] und ν die kinematische Viskosität [m²/s]. Beispiele für Newton Fluide sind Wasser, Öl, Plasma oder Gas. Beispiele für Nicht-Newton Fluide sind Fett, Glas oder Ketchup. Vollblut wird als pseudoplastisches Fluid bezeichnet.

Die mittlere relative Viskosität ist definiert als $\eta_r = \eta / \eta_0$

(dynamische Viskosität / Viskosität des Lösungsmittels)¹¹⁸.

Blutplasma kann mit seinem hohen Wassergehalts von ca. 90 %, bei einem Proteingehalt von ca. 6,5 - 8 %, als Newton Fluid betrachtet werden¹¹⁹. Es ist nicht in der Lage, in Ruhe eine Schubspannung aufzunehmen.

Die mittlere relative Viskosität des Plasmas beträgt, auf Wasser bezogen 2,1 (1,9 – 2,6) und die relative Dichte 1,026¹⁰⁶. Bei Körpertemperatur (wie auch in den Versuchen eingehalten) ergeben sich gerundet die Stoffwerte von

Dichte: $\rho = 1018 \text{ kg/m}^3$

Dynamische Viskosität: $\eta = 151 \cdot 10^{-5} \text{ kg/(m}\cdot\text{s)}$

Die in den Messungen verwandte isotonische Kochsalzlösung und die PSP-Lösung sind ebenfalls Newton Fluide. Als Werte für Dichte und dynamische Viskosität können die von Tränenflüssigkeit angenommen werden. Die relative Dichte liegt bei 1,004 – 1,005¹¹⁸ und die relative Viskosität liegt zwischen 1,26 – 1,32. Es ergeben sich somit gerundete Werte von

Dichte: $\rho = 997 \text{ kg/m}^3$

Dynamische Viskosität: $\eta = 93 \cdot 10^{-5} \text{ kg/(m}\cdot\text{s)}$

Der vermeintlich große Unterschied in der dynamischen Viskosität relativiert sich in Anbetracht des Faktors 10^{-5} . Synovialflüssigkeit kann im Extrembereich z.B. eine relative Viskosität von > 300 ¹¹⁸ annehmen.

Isotone Kochsalzlösung kann aufgrund der beschriebenen Stoffeigenschaften als Modellflüssigkeit hinreichend gut Plasma darstellen. Sie ist somit geeignet für die durchgeführten Untersuchungen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Allgemeine Grundlagen aus der Strömungslehre

Für die Interpretation der gewonnenen Daten bedarf es der Kenntnis einiger grundlegender Gesetzmäßigkeiten aus der Strömungslehre, die im Folgenden erläutert werden.

In der Strömungslehre wird zwischen laminarer und turbulenter Strömung unterschieden. Die Strömungsart kann für die jeweilige Flüssigkeit durch die dimensionslose Reynoldszahl (Re) bestimmt werden. Sie ergibt sich aus dem Volumenstrom bezogen auf den Gesamtquerschnitt der Kapillaren. Der Umschlag von laminar auf turbulent geschieht bei einer kritischen Reynoldszahl von $Re=2320$ ¹²⁰. Die genaue Formel für die Reynoldszahl lautet¹²¹:

$$Re = v_K \cdot d_{iK} \cdot \frac{\rho}{\eta} \text{ [dimensionslos]}$$

d_{iK} ist dabei der Innendurchmesser des Rohres (hier der Kapillaren, $d_{iK} = 300 \text{ }\mu\text{m}$)

v_K ist die mittlere Geschwindigkeit im Rohr (in den Kapillaren) und errechnet sich aus dem Gesamtquerschnitt (A_{ges}) und dem Volumenstrom (V):

$$v_K = V / A_{ges} = 4 \cdot V / (d_{iK}^2 \cdot \pi \cdot n_K)$$

n_K = Anzahl der Kapillaren ($n_K = 4215$ / Bündel)

ρ = Dichte (s.o.)

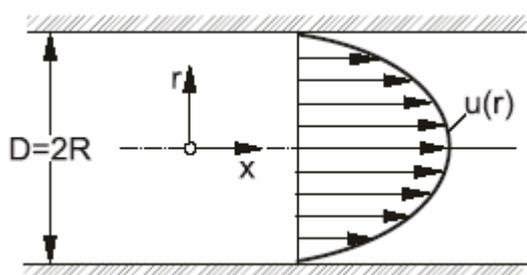
η = dynamische Viskosität (s.o.)

Hieraus ergibt sich:

$$Re = \frac{4 \cdot V \cdot \rho}{d_{iK} \cdot \pi \cdot n_K \cdot \eta}$$

Die hier verwendeten Flussraten gehen von 50 – 300 ml/min. Das entspricht einem Volumenstrom von $V = 8,3 - 50 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$. Für den hier beschriebenen Bioreaktor liegt die Reynoldszahl für Plasma somit zwischen $Re = 0,282 - 3,394$ und für isotone Kochsalzlösung zwischen $Re = 0,448 - 5,397$. Für beide Flüssigkeiten liegt sie also in ähnlichen Bereichen und sehr deutlich unterhalb der kritischen Reynoldszahl. In den Kapillaren herrscht somit eine laminare Strömung. Diese hat gegenüber einer turbulenten Strömung sowohl Vor- als auch Nachteile. Sie ist in ihren Eigenschaften unabhängig von der Rauigkeit der Oberfläche und die Gefahr einer Thrombenbildung ist geringer. Andererseits sind in einer turbulenten Strömung Querkräfte zur Strömungsrichtung vorhanden, welche sich günstig auf die Diffusion auswirken würden. Daher spricht man bei turbulenter Strömung auch von turbulenter Diffusion, zusätzlich zur molekularen Diffusion ¹²¹. Eine turbulente Strömung ließe sich in den Kapillaren nur durch eine deutliche Erhöhung des Durchmessers und /oder der Flussrate erreichen. Im Anfangsbereich der Kapillaren ließe sich für eine sehr geringe Strecke (maximal einige Millimeter) eine turbulente Strömung erreichen, indem man in der Kappe eine solche erzeugt. Sie würde sich in den Kapillaren fortpflanzen, bevor sie sich laminar ausrichtet. In den Kappen ist aber wiederum eine laminare Strömung anzustreben, da es hier aufgrund von Toträumen leicht zur Thrombosierung und zur Embolisation im System kommen kann. Die „ideale“ Kombination von Laminarität in den Kappen und Turbulenz in den Kapillaren ist nicht realisierbar.

Die laminare Strömung in den Kapillaren bedeutet, dass sich die Flüssigkeitsteilchen auf Stromlinien parallel zur Rohrachse bewegen ¹²². Eine Durchmischung findet, wenn überhaupt, nur durch molekulare Wirbel statt, welche auftreten können. Es bildet sich ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aus. (Abb. 23). Die Geschwindigkeit ist in der Rohrmitte am größten und an den Kapillarinnenwänden Null ¹¹⁷.



$$u(r) = \frac{R^2}{4\eta} \left(-\frac{dp}{dx} \right) \left[1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right]$$

Abb. 23: Laminares Geschwindigkeitsprofil und Formel für die axiale Geschwindigkeitskomponente $u(r)$ (nach R. Wille ¹¹⁷)

Der resultierende Stofftransport setzt sich aus verschiedenen Transportvorgängen zusammen, welche von den gegebenen physikalischen Gesetzmäßigkeiten unterschiedlich stark beeinflusst werden. Allen gemein ist, dass ein Gradient, d.h. ein lokaler Unterschied in der jeweils

treibenden Größe, bestehen muss. Dabei verhält sich der Transport proportional zur Größe des Gradienten. Möglich ist Stofftransport durch Diffusion und Filtration (sog. reiner Stofftransport) aufgrund von Konzentrations- und/oder Druckgradienten nach dem Fickschen Gesetz oder der Starlingschen Hypothese (s.u.) und Stofftransport im Rahmen von Impuls- und Wärmetransport. Die einzelnen Anteile setzen sich gemäß der folgenden Gesetze bzw. Formeln zusammen.

Diffusion

Ein rein physikalischer Stofftransport aufgrund eines Konzentrationsgradienten gemäß dem 1. Fickschen Gesetz (vereinfacht für den eindimensionalen Fall):

$$\dot{n} = -D \cdot \frac{dc}{dx}$$

$$\dot{n} = \text{Stoffstromdichte} \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right]$$

$$D = \text{Diffusionskoeffizient} \left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right]$$

$$\frac{dc}{dx} = \text{Konzentrationsgradient} \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \cdot \text{m}} \right]$$

Filtration

Ein rein physikalischer Stofftransport aufgrund eines Druckgradienten gemäß der Starlingschen Hypothese:

$$V = K \cdot (p_{\text{Kap}} + \pi_{\text{IF}} - p_{\text{IF}} - \pi_{\text{Kap}})$$

$$V = \text{Volumenstrom durch die Kapillarporen} \left[\frac{\text{m}^3}{\text{s}} \right]$$

$$K = \text{Filtrationskoeffizient} \left[\frac{\text{m}^4 \cdot \text{s}}{\text{kg}} \right]$$

$$p_{\text{Kap}} = \text{Hydrostatischer Druck in den Kapillaren} \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa} \right]$$

$$\pi_{\text{IF}} = \text{Kolloidosmotischer Druck im extrakapillären Raum} \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa} \right]$$

$$p_{\text{IF}} = \text{Hydrostatischer Druck im extrakapillären Raum} \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa} \right]$$

$$\pi_{\text{Kap}} = \text{Kolloidosmotischer Druck in den Kapillaren} \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa} \right]$$

Wärmetransport

Der Transport von Flüssigkeitsteilchen (mit daraus resultierendem Stofftransport) aufgrund von Temperaturgradienten gemäß dem 1. Fourierschen Gesetz:

$$\dot{q} = -\lambda \cdot \frac{dT}{dx}$$

$$\dot{q} = \text{Wärmestromdichte} \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2} \right]$$

$$\lambda = \text{Wärmeleitkoeffizient} \left[\frac{\text{W}}{\text{m} \cdot \text{K}} \right]$$

$$\frac{dT}{dx} = \text{Temperaturgradient} \left[\frac{\text{K}}{\text{m}} \right]$$

Impulstransport

Der Transport von Flüssigkeitsteilchen aufgrund von Geschwindigkeitsgradienten gemäß dem Newtonschen Schubspannungsansatz. Der Stofftransport verbessert sich durch eine schnellere Nachlieferung von Teilchen (hier nur laminarer Anteil):

$$\tau = -\eta \cdot \frac{dv_x}{dy} = -\rho \cdot \nu \cdot \frac{dv_x}{dy}$$

$$\tau = \text{(laminare) Schubspannung} \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa} \right]$$

$$\eta = \text{Dynamische Viskosität} \left[\frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}} \right]$$

$$\frac{dv_x}{dy} = \text{Geschwindigkeitsgradient} [\text{s}^{-1}]$$

$$\rho = \text{Dichte} \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right]$$

$$\nu = \text{Kinematische Viskosität} \left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right]$$

Der Anteil durch Wärmetransport bei den hier durchgeführten Messungen wird als vernachlässigbar betrachtet, da die Messungen unter isothermen Bedingungen durchgeführt wurden

In der Gleichung zur Diffusion ist der Diffusionskoeffizient eine Proportionalitätskonstante ¹²³ und somit während der einzelnen Messungen und für alle Messungen gleich. Er beschreibt die Beweglichkeit der Teilchen. Das Minuszeichen ergibt sich aus der entgegengesetzten Richtung

von Nettostromvektor und Konzentrationsgradienten. Unterschiede bei der Diffusion zwischen den einzelnen Messungen können sich nur durch die unterschiedlichen Konzentrationen im Intra- und Extrakapillarraum ergeben. Beim Cross Flow stellt sich theoretisch aufgrund der entgegengesetzten Flussrichtung in den beiden Kapillarbündeln (Gegenstromprinzip) über die Länge der Kapillaren ein sehr gleichmäßiger Konzentrationsgradient ein. Dies begünstigt den Stoffaustausch. Da es sich um den Nettostrom, also die Differenz aller Teilströme, über eine Referenzfläche handelt, beeinflusst die unterschiedliche Austauschfläche bei einem oder beiden Kapillarbündeln das Ergebnis nicht. Die theoretische Halbierung des initialen Bolus bei Verteilung auf die doppelte Anzahl an Kapillaren beeinflusst das Ergebnis aber sehr wohl.

Der Filtrationskoeffizient ist, wie der Diffusionskoeffizient eine Proportionalitätskonstante. Der Anteil des hydrostatischen Drucks bei der Durchmischung im Bioreaktor ist bei den beiden Diffusionsmodi und beim Cross Flow Modus, bis auf den Anfang der Kapillaren, sicherlich anders als bei Perfusion. Während die Bewegung der Fluidteilchen bei Diffusion theoretisch die gesamte Zeit parallel zur Kapillarachse verläuft, sind die Fluidteilchen bei Perfusion gezwungen, ihre Bewegungsrichtung irgendwann auf die Kapillarwand hin zu richten, da ihnen der „gerade“ Weg bei der Ausflussskappe versperrt ist. Wie bereits von Catapano et al.¹¹³ beschrieben kann der Fluss über die Membran als rechtwinklig zu dieser angenommen werden. Bei den Diffusionsmodi und dem Cross Flow Modus nehmen die Druckgradienten zur Mitte der Kapillaren hin ab und dann mit entgegengesetztem Vorzeichen wieder zu⁹⁰. Bei der Perfusion nehmen die Druckgradienten über die gesamte Kapillarlänge ab („einlaufendes“ Bündel) bzw. zu („ablaufendes“ Bündel). Der hydrostatische Druck in den Kapillaren ist umso größer, je höher die Flussrate ist. Die Verteilung des Flüssigkeitsvolumens auf zwei Kapillarbündel halbiert die Geschwindigkeit in den Kapillaren, was wiederum den Austausch aufgrund der Filtration senkt⁹⁰. Dies erklärt möglicherweise die relativ lange Mischzeit bei Diffusion durch beide Kapillarbündel mit 50 ml/min. Der kolloidosmotische Druck ist im zellfreien Reaktor allein von der Konzentration des PSP abhängig und gleicht sich entsprechend mit zunehmender Durchmischung zwischen dem intra- und extrakapillären Raum an. In einem mit vitalen Zellen befüllten Reaktor bewirkt die biochemische Aktivität der Zellen eine wesentlich komplexere Zusammensetzung des kolloidosmotischen Drucks. Der Cross Flow, auch Querstromprinzip oder Tangentialflussfiltration genannt, bezeichnet im Allgemeinen die schnelle tangentielle Anströmung einer Filtrationsmembran zu Vermeidung der Bildung eines Filterkuchens, wie er bei der lotrechten Anströmung entstehen würde. Dieses Prinzip findet letztlich sowohl beim Cross Flow als auch bei Diffusion durch beide Kapillarbündel statt. Durch die Anordnung der Kapillare beim Cross Flow wird zusätzlich ein Gegenstrom erzeugt, der das Prinzip gegenüber der rechtwinkligen Kapillaranordnung unterstützt und für eine gleichmäßigere Verteilung im Extrakapillarraum sorgt.

Der Stoffaustausch aufgrund des Impulstransportes ist vom Geschwindigkeitsgradienten abhängig. Wie zuvor beschrieben, ist die Geschwindigkeit bei laminarer Strömung direkt an der Kapillarenwand Null (Wandhaftbedingung, Abb. 23). Die Geschwindigkeit des Fluids im Extrakapillarraum parallel zu den Kapillaren ist ebenfalls mit etwa Null anzunehmen, so dass hier kein Geschwindigkeitsgradient besteht. Entsprechend findet keine Durchmischung aufgrund eines Impulstransportes statt. Zur Erfüllung der Wandhaftbedingung muss zumindest direkt an der Wand ein Wirbelvektor ungleich Null bestehen¹¹⁷. Die Wirbeldiffusion in dieser sog. Grenzschicht ist von der Zähigkeit (gleichgerichtet) und von der Geschwindigkeit (reziprok) des Fluids abhängig. Die Zähigkeit ist im Versuch annähernd konstant. Die Geschwindigkeit in den Kapillaren ist bei unterschiedlichen Flussraten offensichtlich unterschiedlich, aber auch für die vier Laufmodi unterschiedlich. Bei doppelter Anzahl der Kapillarbündel ist die Geschwindigkeit gemäß der Kontinuitätsgleichung $v_1 = \frac{A_2}{A_1} \cdot v_2$ halbiert. Die (axiale)

Geschwindigkeit über die Länge der Kapillare kann zumindest bei Perfusion nicht konstant sein, da der Auslauf verschlossen ist. Bei den beiden Diffusionsmodi und dem Cross Flow Modus lässt sich annehmen, dass aufgrund der Durchmischungsvorgänge auch hier eine Veränderung der Geschwindigkeit über die Länge stattfindet, analog zu den Druckgradienten bei der Filtration. An den Ein- und Auslaufkappen muss jeweils dieselbe Geschwindigkeit herrschen. Die Wirbeldiffusion müsste also bei höheren Flussraten und bei Diffusion durch ein Kapillarbündel einen geringeren Einfluss haben als bei den anderen Einstellungen, da sie mit steigender Geschwindigkeit weniger wird. Beim Cross Flow, und somit wie zuvor beschrieben auch etwas geringer bei der Diffusion durch beide Kapillarbündel, könnte theoretisch zusätzlich ein Drall entstehen. Dafür wäre eine um die Kapillaren rotierende Flussbewegung nötig. Ein Drall würde in Wechselwirkung mit dem Impulstransport stehen und die Durchmischung unterstützen. Aufgrund der hier durchgeführten Messungen ist es allerdings unmöglich die Existenz eines solchen Dralls zu bestätigen oder zu verneinen.

Die kürzeren Mischzeiten bei zunehmender Flussrate lassen sich sicherlich am einfachsten durch die häufigere Passage des Fluids durch den Reaktor pro Minute erklären. Hinzu kommen aber die geschwindigkeitsabhängigen Effekte aufgrund des hydrostatischen Drucks und der Wirbeldiffusion. Die Mischzeiten bei Perfusion und Diffusion durch ein Kapillarbündel deuten darauf hin, dass der positive Einfluss der Flussrate ab einem bestimmten Punkt, in diesem Fall bei etwa 150 ml/min, gegenüber anderen Faktoren ins Hintertreffen gerät. Bei der Diffusion durch ein Kapillarbündel wäre es denkbar, dass der Impuls der Teilchen in axialer Richtung ab dieser Geschwindigkeit die Bewegungen aufgrund der Druck- und Konzentrationsgradienten zunehmend unterbindet. Zusätzlich nimmt bei steigender Flussrate die Dicke der Grenzschicht und somit die Wirbeldiffusion ab. Bei der Diffusion durch beide Kapillarbündel wird erst bei einer

Flussrate von 300 ml/min eine entsprechende Geschwindigkeit des Fluids in den einzelnen Kapillaren erreicht. Bei der Perfusion wird die axiale Bewegung der Teilchen zwangsläufig unterbrochen. Untersuchungen an von Wasser oder Blut umströmten Hohlfasermembranen zeigten, dass wenn der Winkel zwischen den Fasern (Kapillaren) und der Hauptstromrichtung größer als $\pm 38^\circ$ ist, der Massentransport nur noch sehr gering von einer steigenden Flussrate beeinflusst wird¹²⁴. Wie bereits beschrieben kann der Winkel zwischen den Kapillaren und der Hauptstromrichtung bei Perfusion im hier untersuchten System mit 90° angenommen werden¹¹³. Die langen Mischzeiten bei Diffusion durch beide Kapillarbündel und beim Cross Flow bei 50 ml/min deuten darauf hin, dass hier aufgrund der geringen Geschwindigkeit des Fluids in den Kapillaren (doppelte Anzahl gegenüber den anderen Laufmodi) möglicherweise kein ausreichender hydrostatischer Druck aufgebaut werden kann. Ab einer Flussrate von 75 ml/min lässt sich der geringere hydrostatische Druck offenbar durch die größere Austauschfläche für die allgemeinen Diffusionsprozesse und durch die stärkere Wirbeldiffusion ausgleichen. Hierbei ist zu bedenken, dass die Wirbeldiffusion nicht nur durch die geringere Geschwindigkeit des Fluidstroms, sondern zusätzlich noch durch die doppelte Austauschfläche positiv beeinflusst wird. Ab dieser Flussrate liegen die Mischzeiten für Diffusion durch beide Kapillarbündel und Cross Flow sehr nahe beieinander.

4.3 Diskussion der Hypothesen

Ziel der Studie war der Vergleich unterschiedlicher Laufmodi und Flussraten zur Bestimmung der Flüssigkeits- und Massenverteilung in einem dreidimensionalen Hohlfasermembran Bioreaktor. Hierzu wurden die im Folgenden diskutierten Hypothesen aufgestellt.

1. *Die Flussrate und der Laufmodus beeinflussen die Mischzeit bis zum Erreichen eines festgelegten Durchmischungsgrades.*

Vergleicht man die unterschiedlichen Flussraten bei konstantem Laufmodus, so zeigt sich eine deutliche Beeinflussung der Mischzeit durch die gewählte Flussrate. Ebenso ergibt der Vergleich der unterschiedlichen Laufmodi bei konstanter Geschwindigkeit eine Beeinflussung der Mischzeit durch die Wahl des Laufmodus. Dieser Unterschied ist zwischen Diffusion durch beide Kapillarbündel und Cross Flow insbesondere bei hohen Flussraten nur sehr gering. Die Perfusion und die Diffusion durch ein Kapillarbündel zeigen insgesamt recht deutliche Unterschiede gegenüber den beiden anderen Laufmodi. Lediglich bei einer Flussrate von 150 ml/min liegen die Mischzeiten für alle vier Laufmodi relativ nahe beieinander. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die Hypothese, dass die Flussrate und der Laufmodus die Mischzeit bis zum Erreichen eines festgelegten Durchmischungsgrades beeinflussen.

2. Höhere Flussraten führen zu einer rascheren Durchmischung.

Für die Diffusion durch beide Kapillarbündel und den Cross Flow lässt sich diese Hypothese bestätigen. Für die Perfusion und die Diffusion durch ein Kapillarbündel muss sie jedoch abgelehnt werden. Zwar zeigt sich für die im Stand-By und Therapiebetrieb eher üblichen Flussraten bis 150 ml/min eine Abnahme der Mischzeiten mit steigender Flussrate, doch steigt die Mischzeit bei noch höheren Flussraten zunächst wieder auf ein höheres Niveau. Dieses Ergebnis lässt sich bezüglich der Diffusion durch ein Kapillarbündel möglicher Weise so erklären, dass die Fluid- und PSP-Teilchen bei sehr hohen Flussraten eine sehr starke axiale Bewegung ausführen. Es ist wie bereits beschrieben denkbar, dass ein Punkt überschritten wird, ab dem die Durchmischung aufgrund der Druckgradienten und aufgrund der allgemeinen und der Wirbeldiffusion verhindert oder zumindest erschwert wird, da dies ein Abweichen von der axialen Bewegungsrichtung erfordern würde. Bezüglich der Perfusion kann die reduzierte Beeinflussbarkeit der Durchmischung durch höhere Flussraten angeführt werden. Dies erklärt jedoch nur eine Stagnation und nicht die Zunahme der Mischzeiten.

3. Bei gleicher Flussrate führen Perfusion und Cross Flow zu einer rascheren Durchmischung als die beiden Diffusionsmodi.

Diese Hypothese muss eindeutig abgelehnt werden. Bis auf die niedrigste Flussrate zeigt die Diffusion durch beide Kapillarbündel kürzere bzw. ähnliche (150 ml/min) Mischzeiten im Vergleich zur Perfusion. Insbesondere zu den höheren Flussraten hin zeigen sich deutliche Vorteile für die Diffusion durch beide Kapillarbündel. Bei einer Flussrate von 50 ml/min sind die Relationen der Mischzeiten verdreht. Die Perfusion und die Diffusion durch ein Kapillarbündel zeigen deutlich kürzere Mischzeiten als die beiden anderen Laufmodi. Bezöge man die Hypothese nur auf den Cross Flow ließe sie sich mit Einschränkungen bestätigen. Bis auf die niedrigste Flussrate von 50 ml/min zeigen sich für Cross Flow die günstigsten Durchmischungszeiten. Die Unterschiede in den Durchmischungszeiten zur Diffusion durch beide Kapillarbündel sind jedoch insgesamt nur sehr gering.

4. Diffusion durch beide Kapillarbündel zeigt eine raschere Durchmischung als Diffusion durch ein Kapillarbündel.

Der Vergleich der beiden Diffusionsmodi zeigt uneinheitliche Ergebnisse. Größtenteils zeigt die Diffusion durch beide Kapillarbündel kürzere Mischzeiten als die Diffusion durch ein Kapillarbündel. Diese Ergebnisse liegen, wie bereits beschrieben, vermutlich an der doppelten Austauschfläche bei der Diffusion durch beide Kapillarbündel. Sehr deutlich zeigen sich die Unterschiede bei Flussraten ≥ 200 ml/min. Allerdings sind bei 150 ml/min und besonders bei 50 ml/min die Mischzeit für Diffusion durch ein Kapillarbündel kürzer als für Diffusion durch

beide Kapillarbündel. Da sich die Hypothese nicht eindeutig bestätigen lässt, muss sie abgelehnt werden.

5. Die Bauweise des Bioreaktors ermöglicht eine effektive Flüssigkeits- und Massenverteilung im System.

Das System zeigt im zellfreien Zustand insgesamt relativ kurze Mischzeiten. Lediglich bei einer Flussrate von 50 ml/min zeigen die Diffusion durch beide Kapillarbündel und der Cross Flow längere Mischzeiten bis zum Erreichen einer Homogenität von $h \leq 0,1$. Der zellbefüllte Reaktor zeigt zwar deutlich längere Mischzeiten (etwa zwei- bis dreimal so lang), aber auch diese können noch als befriedigend betrachtet werden. Die relativ gleichmäßigen Kurvenverläufe bei Diffusion durch beide Kapillarbündel bei höheren Flussraten und insbesondere bei allen Cross Flow Messungen sprechen für eine effektive Flüssigkeits- und Massenverteilung im System. Die Perfusion zeigt ebenfalls insgesamt relativ gleichmäßige Kurvenverläufe. Die teilweise sehr starken initialen Peaks bei der Diffusion durch ein Kapillarbündel und bei niedrigen Flussraten durch beide Kapillarbündel sprechen dafür, dass die Flüssigkeits- und Massenverteilung bei diesen Laufmodi am wenigsten effektiv ist.

4.3.1 Empfehlung zur idealen Einstellung

Die hier durchgeführten Messungen wurden hauptsächlich im zellfreien Reaktor durchgeführt. Die verwendete Flüssigkeit enthielt keine (biologischen) Metabolite. Das PSP ist zudem, wie bereits beschrieben, mit einer Molekülmasse von 354,38 Da, deutlich kleiner als Plasma-Molekülen wie Albumin, Fibrinogen oder Immunglobuline mit Molekülmassen von etwa $66-900 \times 10^3$ Da. Diese Limitierungen des Modells sind zu beachten, wenn man eine Empfehlung zur Laufmodus und Flussratenwahl ausspricht. Anderenfalls wäre mit der kürzesten Mischzeit von 02:18 min. die Diffusion durch beide Kapillarbündel bei 300 ml/min zu bevorzugen. Zellprodukte und Plasmabestandteil führen zum sog. „membrane-fouling“. Die Poren der Kapillaren verstopfen, wodurch ein erheblicher Druckanstieg im System entstehen kann¹²⁴. Durch das Wechseln der Ein- und Auslaufkappen im Perfusionsmodus lässt sich eine Flussumkehr über den Kapillarmembranen erreichen. Die Poren der Kapillaren lassen sich so zu einem gewissen Grad wieder freispülen. Der Cross Flow, und etwas geringer die Diffusion durch beide Kapillarbündel, bieten aufgrund der tangentialen Anströmung der Kapillaren ebenfalls einen gewissen Schutz gegen ein Verstopfen der Membranen. Bei diesen beiden Laufmodi ist die Gefahr eines Abreißens von an den Kapillaren haftenden Hepatozyten verringert, da der Druck des aus den Kapillaren austretenden Fluids geringer ist als bei der Perfusion. Weiterhin zu bedenken ist, dass die Flussgeschwindigkeit in den Sinusoiden wie beschrieben bei nur etwa $58,2 \pm 25,8$ mm/min liegt⁴⁰. Die Flussgeschwindigkeiten in den

Kapillaren liegen aber je nach Flussrate bei 112,8 – 676,7 mm/min für beide Kapillarbündel, oder 225,6 – 1353,4 mm/min wenn nur ein Kapillarbündel durchströmt wird. Die Bewegungen des Fluids im Extrakapillarraum sind sehr wahrscheinlich langsamer als in den Kapillaren. Dafür spricht auch dass der maximale Volumenfluss im Reaktor insgesamt deutlich geringer ist als der durch die gesunde Leber (1380 – 1510 ml/min³⁹). Dennoch liegen die niedrigen und mittleren Flussraten sicherlich näher an den physiologischen Bedingungen in der Leber als die sehr hohen Flussraten. Aus dem Modell der isoliert perfundierten Ratten Leber ist bekannt, dass ein zu hoher Perfusionsdruck zu Barotraumatata und ein zu niedriger Perfusionsdruck zu einer inhomogenen Verteilung des Perfusats führen können¹²⁵. Ab einer Flussrate von 200 ml/min zeigen sich bei Diffusion durch beide Kapillarbündel und Cross Flow nur noch relativ geringe Veränderungen der Mischzeiten. 200 ml/min erscheint ein guter Kompromiss zwischen einer möglichst schnellen Durchmischung und möglichst physiologischen Flussgeschwindigkeiten im Extrakapillarraum. Die Diffusion durch ein Kapillarbündel erscheint aufgrund der starken initialen Peak ungünstig. Perfusion und Diffusion durch beide Kapillarbündel haben bis 150 ml/min ähnliche Mischzeiten, zeigen aber beide initiale Peaks, wobei diese bei der Perfusion deutlich weniger ausgeprägt sind. Ab 200 ml/min zeigt die Diffusion durch beide Kapillarbündel eine sehr ausgeglichene Kurve. Der Cross Flow zeigt insgesamt die kürzesten Mischzeiten und insbesondere über alle Messungen hinweg den gleichmäßigsten Anstieg der Kurven. Dies lässt sich sicherlich unter anderem auf das hier angewandte Gegenstromprinzip zurückführen und auf die daraus resultierenden gleichmäßigen Gradienten über die gesamte Kapillarlänge hinweg. Die Empfehlung für den Laufmodus lautet daher eindeutig Cross Flow. Die Diffusion durch beide Kapillarbündel stellt, insbesondere bei Flussraten ab 200 ml/min eine sehr gute Alternative dar. Die Plasmafiltrationsrate liegt im Therapiebetrieb bei 30 – 60 ml/min^{103, 126}. Eine höhere Flussrate im Reaktorkreislauf bedeutet somit eine mehrfache Passage und bessere Durchmischung des Plasmas im Reaktor.

4.4 Vergleich zu anderen Studien

Die hier durchgeführten Untersuchungen lassen nur bedingt den Vergleich mit anderen Systemen zu. Die Bauart und Dimensionierung der derzeit in der klinischen oder präklinischen Testung befindlichen Leberunterstützungssysteme ist sehr vielfältig. Untersuchungen der Strömungsverhältnisse wurden nur sehr vereinzelt durchgeführt. Zudem wurden, wenn Studien vorhanden sind, andere Methoden genutzt bzw. eine andere Art der Datenauswertung und -präsentation gewählt.

Catapano et al.¹¹³ führten einen Vergleich der mittleren Verweildauer von Flüssigkeiten im hier beschriebenen dreidimensionalen Bioreaktor und in einem Flachbett-Dialysator durch. Es

wurden unterschiedliche Operationsmodi (mit und ohne Rezirkulation) und unterschiedliche Flussraten untersucht. Prinzipiell befand sich der Bioreaktor im Perfusionsmodus und im Dialysator wurden die Zellen direkt umflutet. Die Arbeitsgruppe konnte eine deutlich homogenere und effektivere Verteilung der mittleren Verweildauer über die Zeit im Bioreaktor feststellen als im Dialysator. Mathematisch entsprach die Verweildauer in dem, auch in dieser Arbeit untersuchten, dreidimensionalen Bioreaktor einem System 1. Ordnung, wohingegen die Verweildauer im Flachbett-Dialysator nur einem System 2. Ordnung folgte. Des Weiteren konnte gezeigt werden dass die mittlere Verweildauer im Bioreaktor sowohl vom Operationsmodus als auch von der Flussrate abhängig waren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass nach 60 Minuten eine vollständige Durchmischung erreicht wurde, womit die entsprechende in dieser Arbeit getroffene Annahme bestätigt wird. Diese Ergebnisse werden auch von Pfaff et al. bestätigt ¹¹².

In einer weiteren Studie beschreiben Catapano et al. anhand von Blut-Oxygenierungsgeräten die immense Rolle des „membrane-fouling“ auf die Flussdynamik in einem Hohlfasermembran System ¹²⁴. Die durch Ablagerungen entstehende Schicht in den Kapillaren kann demnach bis zu 30% des Gesamtwiderstandes gegen Massentransfer über die Membranen ausmachen. Des Weiteren betont er die Bedeutung des Designs der Ein- und Ausflussskappen für die Strömungsverhältnisse im System. Thromben werden durch Kanten, Hohlräume und schlecht geschnittene bzw. eingegossene Kapillarenden begünstigt und können so das System weiter verstopfen. Bei der Blut-Oxygenierung scheint der Wechsel vom „inside flow“ (Blut intrakapillär) zum „extra-luminal flow“ (Blut extrakapillär) deutliche Vorteile zu bringen ¹²⁷. Da der Intrakapillarraum nicht den Platz für ein ausreichendes Zellvolumen bietet ist der „extra-luminal flow“ keine Option für ein hybrides System. Eine kreuzweise Anordnung der Kapillaren in einem 20° Winkel zueinander konnte den Massentransfer um den Faktor 2,2 steigern. Ein solcher Faktor lässt sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen durch die Cross Flow Anordnung (45°) nicht erreichen, doch zeigt sich auch im hier untersuchten System insgesamt eine deutliche Verbesserung der Durchmischung.

Giorgio et al. stellten für eine verkleinerte Version ihres BAL System zunächst ein mathematisches Modell zum transmembranösen Druckabfall und Flüssigkeitstransport auf und überprüften dieses anschließend durch die Messung von Albumin- und Glucosetransport im System ⁹⁰. Verglichen wurden Flussraten von 10, 30 und 50 ml/min, sowie zwei Laufmodi: Der „sealed“ Modus (ähnlich Diffusion durch ein Kapillarbündel), bei dem Ein- und Ausflussskappe des Kapillarbündels geöffnet sind und der „trans-flow“ Modus (ähnlich Perfusion), bei dem die Ausflussskappe geschlossen ist und das Fluid über eine Kappe im Extrakapillarraum austreten kann. Die gemessenen Konzentrationen für Albumin und Glucose wurden jeweils auf die Konzentration im zuführenden Flüssigkeitsreservoir bezogen. Im Folgenden setzen Giorgio et

al. die gemessenen Daten in einem Computermodell in Bezug zu den errechneten Vorhersagen. Die Ergebnisse werden als transmembranöser Fluss präsentiert, so dass ein Vergleich zu den von uns erhobenen Daten nur durch ein Abschätzen der Mischzeiten anhand der präsentierten Kurven möglich ist. Das BAL System benötigt bei einer Flussrate von 50 ml/min für das Erreichen einer Homogenität von $h \leq 0,1$ für Albumin zwischen 5 und 10 Minuten („trans-flow“) bzw. über 50 Minuten („sealed“) und für Glucose zwischen 3 und 5 Minuten („trans-flow“) bzw. zwischen 20 und 25 Minuten („sealed“). Die etwas kürzeren Mischzeiten im Vergleich zur Perfusion bei 50 ml/min (12:53 min.) relativieren sich, wenn man bedenkt, dass der von Giorgio et al. untersuchte Reaktor lediglich ein Volumen von knapp 40 ml besitzt und man eine noch deutlich schneller Durchmischung als im von uns untersuchten Reaktor, mit einem Volumen von ca. 1300 ml, erwarten würde. Die Mischzeit bei Diffusion durch ein Kapillarbündel mit 50 ml/min (10:24 min.) liegt beim von uns untersuchten Reaktor deutlich niedriger als beim BAL.

Histologische und Immunhistologische Untersuchungen des hier beschriebenen Systems konnten zeigen, dass die dezentralisierte Nährstoff- und Gasversorgung zu einer dem natürlichen Leberparenchym sehr ähnlichen Zellorganisation führt^{107, 108}. Es konnten gallengangs- und sinusoid-ähnliche Strukturen sowie Kollagen I und Laminin als extrazelluläre Matrixkomponenten nachgewiesen werden. Zudem war der Proliferationsmarker Ki-67 IR im Reaktor erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen die effiziente und gleichmäßige Flüssigkeits- und Massenverteilung im Bioreaktor, als Grundlage einer optimalen Versorgung der Zellen.

4.5 Ausblick

Weitere Untersuchungen könnten einerseits zur statistischen Absicherung der gewonnenen Daten dienen, andererseits zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse. So könnte die Hinzunahme einer sehr langsamen Flussrate (z.B. 25 ml/min) zeigen ob die Diffusion durch ein Kapillarbündel dann ähnlich der Diffusion durch beide Kapillarbündel reagiert und deutlich längere Mischzeiten zeigt. Die Hinzunahme einer sehr hohen Flussrate (>300 ml/min) bei Diffusion durch beide Kapillarbündel und Cross Flow könnte bestätigen, dass hier eine für die Durchmischung ungünstige Fluid-Geschwindigkeit in den Kapillaren herrscht, ähnlich der Diffusion durch ein Kapillarbündel bei Flussraten >150 ml/min.

Die derzeitigen Limitierungen bei der Therapie des ALV lassen sich offensichtlich nicht nur durch die Konstruktion eines (strömungs-)technisch idealen Bioreaktors lösen. Ein weiterer wichtiger Parameter ist das verwendete biologische Material. Ein viel versprechender Ansatz für die Therapie des ALV ist die Verwendung von hepatogenen Vorläuferzellen. Die Ovalzellen (benannt nach der Form ihres Zellkerns¹²⁸) sind ortständige, mindestens bipotente

Vorläuferzellen (hepatozytär und biliär) ^{2-4, 129}. Eine weitere Quelle für hepatogen differenzierbare Zellen scheint das Knochenmark zu sein. Dort vorhandene hämatogene Vorläuferzellen konnten im Tierversuch abgestoßene Lebertransplantate regenerieren ¹³⁰. In Sektionspräparaten von Patientinnen, denen jeweils Knochenmark von männlichen Spendern transplantiert worden war, konnten Y-Chromosomen im Leberparenchym nachgewiesen werden ¹³¹. Jüngere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass diese Befunde nicht durch eine Transdifferenzierung der hämatogenen Vorläuferzellen entstanden, sondern durch die Fusion von Spender- und Empfängerzellen ^{5, 132}. Auch gibt es Hinweise, dass eine Co-Kultur aus Ovalzellen und mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark die jeweilige Proliferationsrate deutlich steigern kann ¹³³. Die Untersuchung und der Einsatz embryonaler Stammzellen erscheinen ebenfalls viel versprechend, werfen aber die ethisch-moralischen und rechtlichen Fragen auf, die allgemein bei der Verwendung solcher Zellen bestehen. Embryonale Stammzellen bieten gegenüber adulten Stammzellen die potentielle Möglichkeit ein komplettes Organ *in vitro* züchten zu könne, schulden aber bis jetzt den Beweis dafür ¹³⁴. Hinzu kommt ein erhöhtes neoplastisches Risiko. Adulte Stammzellen bieten eher die Möglichkeit eines Gewebeersatzes, bisher konnten jedoch keine ausreichenden Zellzahlen erreicht werden.

Der in dieser Studie untersuchte Bioreaktor könnte zur Kultivierung und zum upscaling (Vermehrung) von autologen hepatogenen Vorläuferzellen dienen, während zeitgleich ein weiterer Bioreaktor mit heterologen Zellen zur extrakorporalen Leberunterstützung am Patienten eingesetzt wird. Viel versprechend ist dabei die erhöhte Aktivität des Proliferationsmarkers Ki-67 IR im Bioreaktor ¹⁰⁷. Die Unterstützung des Regenerationspotentials der Leber durch die *in vitro* vermehrten Zellen könnte die Heilungsphase möglicherweise verkürzen. Eine extrakorporale Leberunterstützung zur Überbrückung wäre dann möglicherweise ausreichend und die Transplantation einer heterotopen Leber unnötig. Dies sind momentan jedoch reine Zukunftsvisionen.

Seit vielen Jahren forschen weltweit Arbeitsgruppen an den biologischen, technischen, hybriden und neuerdings regenerativen Ansätzen zur Therapie des Leberversagens. Das Ziel diese Arbeit war es einen Beitrag zum Verständnis des hier untersuchten Systems zu leisten.