

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsorgane und Versuchgruppenleitung

Es wurden für die Versuche jeweils ein isolierter Jejunumabschnitt von neun gesunden Schweinen (deutsche Landrasse-Hybriden) verwendet. Die Dünndärme der Tiere wiesen keine äußeren Verletzungen auf. Das Gewicht der explantierten Darmabschnitte lag zwischen 100 und 350 g, ihre Länge betrug jeweils ca. 150 (\pm 30) cm.

Die Cadmiumapplikation erfolgte in verschiedenen Dosierungen von jeweils 1 mg bei vier Jejuni und 10 mg bei 5 weiteren Jejuni.

Die 140 ml Nährlösung bestehend aus 14 ml Dipeptamin (L-Alanin und L-Glutamin), 126 ml NaCl und 4 g darin gelöstem Maltosepulver wurde die jeweilige Menge Cadmium beigegeben. Diese Mischung wurde – auf 37 °C erwärmt – als Bolus zu Beginn der Perfusion intraluminal verabreicht und passierte nun durch kontraktive Aktion die Schleimhaut des resorbierenden Darmes.

2.2 Organgewinnung und -vorbereitung

2.2.1 Organgewinnung

Zur Einleitung der Operation erhielten die Tiere folgende Narkose: 0,25 bis 0,5 mg/kg KG Etomidate (Braun, Melsungen) und 4 mg Pancuronium (Curamed, Karlsruhe) intravenös. Die Aufrechterhaltung erfolgte als Inhalationsnarkose mit 40 % O₂, 60 % N₂O und 1,5 bis 1,8 % Isofluran (Curamed, Karlsruhe). Intraoperativ wurde das Tier durch Einbluten getötet. Der Jejunumabschnitt wurde relativ proximal, ca. 20 cm hinter dem Treitz-Band abgesetzt. Die versorgende Arteria jejuni wurde mit einer Heidelberger Verlängerung (Fresenius Hemocare, Bad Homburg) kanüliert und umgehend an den Perfusionskreislauf angeschlossen. Die warme Ischämiezeit (Zeitraum vom Tod des Tieres durch Einbluten bis zur Explantation des Darmabschnittes) betrug bei allen Versuchen 8 bis 15 Minuten. Da der Anschluss an die Perfusionsapparatur unverzüglich nach Organentnahme erfolgte, die kalte Ischämiezeit also nur wenige Sekunden andauerte, wurde eine Gesamtischämiezeit von 15 Minuten nicht überschritten.

2.2.2 Blutgewinnung

Als Perfusat wurde für alle Perfusionen autologes Blut des Spendertieres verwendet. Es wurden hierfür ca. 1000 ml Blut benötigt, welche unter Zusatz von Heparin (10.000 IE, Hoff-

mann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) in Compoflex-Blutbeuteln (Fresenius Hemocare, Bad Homburg) aufgefangen wurden.

2.3 Versuchsaufbau

Die verwendete Perfusionsapparatur bestand aus einem Dialysatkreislauf und einem Hämoperfusionskreislauf (Abb. 3).

Dialysatkreislauf: Die Passage im Dialysatkreislauf dient zur Erwärmung des Blutes und seiner Versorgung mit Elektrolyten, Nährstoffen, Sauerstoff. Über einen an den Wärmeaustauscher (Sorin Biomedica Cardio, Saluggia, Italia) anschließenden Wasserkreislauf mit Heizpumpe (Julabo Labortechnik, Seelbach) wird das Dialysat, und damit über das Dialysemodul auch der Perfusionskreislauf auf ca. 38 °C erwärmt. Die Oxygenierung findet im Dialysatbehälter durch Begasung mit einem Sauerstoff-Raumluft-Gemisch (80 % O₂) sowie bei Bedarf Kohlendioxid (zur pH-Einstellung) statt. Das Dialysat wird vom Dialysebehälter mit einer Rollenpumpe (Stöckert, München) über einen Wärmeaustauscher zum Dialysemodul (Hemoflux F7 HPS Kapillardialysator, Fresenius, Bad Homburg) geleitet. Hier findet ein Gas-, Soluten- und Wärmeaustausch statt, indem Blut und Dialysat im Gegenstromprinzip entlang einer semipermeablen Membran aneinander vorbeifließen. Das Dialysemodul ist für Moleküle bis zu einer Größe von 5.000 Dalton durchlässig und gewährt einen Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Dialysat. Somit kann das Blutvolumen und damit der Hämatokrit den Versuherfordernissen angepasst werden. Des Weiteren kann über den Wärmeaustauscher die Bluttemperatur reguliert werden. Die Zusammensetzung des Dialysats ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 5: Zusammensetzung der Dialysatflüssigkeit

Substanz	Konzentration
NaCl	110 mmol/l
KCl	4 mmol/l
CaCl ₂	1,5 mmol/l
MgCl ₂	1 mmol/l
NaHCO ₃	20 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	0,5 mmol/l
Glukose	144 mg/dl
Harnstoff	30 mg/dl
Kreatinin	6 mg/dl

Perfusionskreislauf: Im Perfusionskreislauf wird das Blut mittels zweier je vor und nach das Dialysem modul geschalteter Rollenpumpen (Watson-Marlow, Rommerskirchen) über eine Luftfalle zum Darm geführt. Vor die kanülierte Arteria jejuni sind ein Druckmesser und ein Temperaturfühler angebracht. Ein etwa 1.000 ml fassendes Gefäß dient als Blutreservoir, welches das venöse intestinale Blut empfängt. Dieses Reservoir steht auf einer Waage (Sartorius, Göttingen) und leitet das Blut über die untere Rollenpumpe zum Dialysem modul weiter. Eine Steuerungseinheit (Mediport Biotechnik, Berlin) bildet den zentralen Punkt des Perfusionskreislaufes. Über sie kann die Pumpenumdrehungszahl und damit der Perfusionsfluss geregelt werden. Auch die Waage des Blutreservoirs ist mit dieser Steuerungseinheit verbunden und kann durch Eingabe eines Reservoir-Sollgewichtes die Dilution des Blutes regulieren. Die Steuerungseinheit kann eine schnellere und langsamere Umdrehungszahl der unteren Rollenpumpe auslösen und somit das Reservoirgewicht/die Dilution des Blutes aufrechtzuerhalten bzw. anzupassen. Diese Einstellungen sind auch manuell regelbar. Alle wieder verwendbaren Teile des Perfusionsaufbaus wurden nach jeder Perfusion gereinigt und dampfsterilisiert. In Tabelle 6 sind die Grenzwerte der Einstellmöglichkeiten der Perfusionsapparatur aufgeführt:

Tabelle 6 Einstellungen Perfusionsapparatur

Perfusionsfluss	50 bis 250 ml/min
Perfusionsdruck	bis 300 mmHg
Waagebereich: Blutreservoir	bis 3.000 g
Wassertemperatur (Heizpumpe)	20 bis 70 °C
Dialysatfluss	bis 5.000 ml/min
Bluttemperatur	bis 45 °C

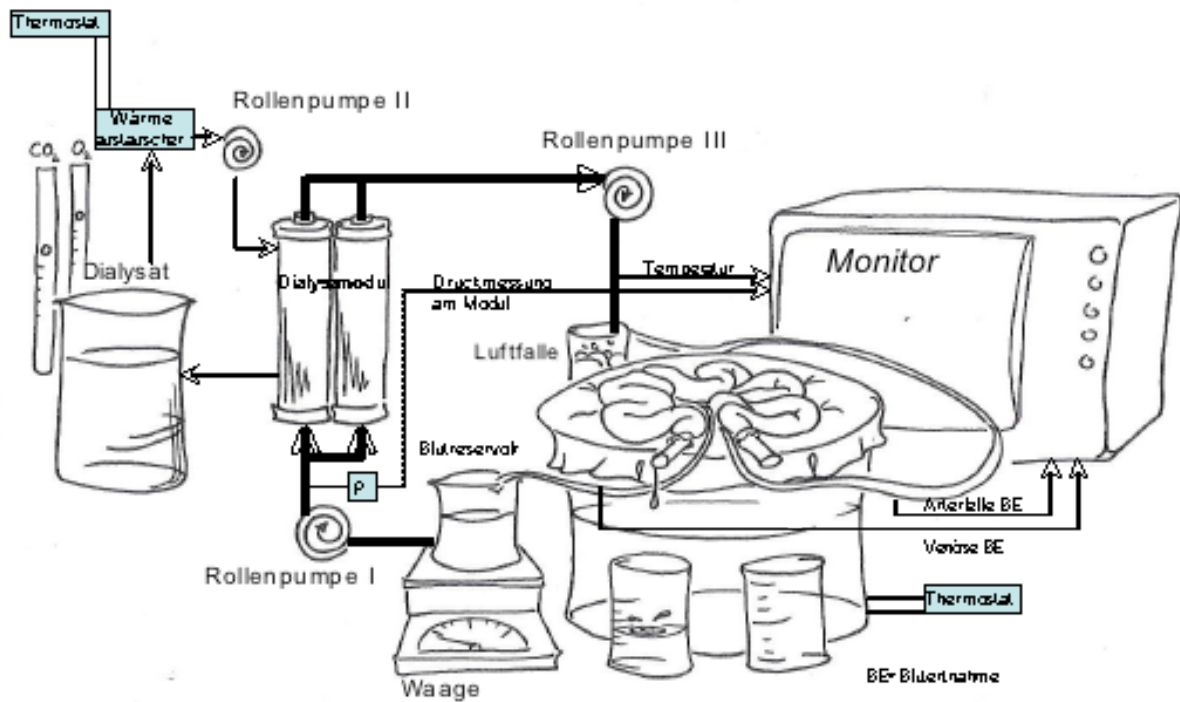


Abbildung 3: Aufbau der Perfusionsapparatur

2.4 Herstellung und Applikation der Prüfsubstanzen

Die applizierte Menge Cadmiumchlorid (Sigma-Aldrich, München), in den Versuchen 10 mg bzw. 1 mg, wurde mittels einer Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen) abgemessen. Das Cadmiumchlorid wurde in die Nährlösung (Maltose + Dipeptidamin + NaCl) gegeben und mit dieser als Bolus zu Versuchsbeginn intraluminal verabreicht.

Sämtliche Arbeiten mit Verwendung von Cadmiumchlorid wurden nach den Anweisungen eines staatlich geprüften Lebensmittelchemikers mit Handschuhen, Mundschutz und in staubarmer Umgebung unter einem Abzug durchgeführt.

Die mit Cadmiumchlorid versetzte Nährlösung wurde zu Versuchsbeginn ins Darmlumen gegeben. Dieser Bolus besaß ein Volumen von 140 ml und wurde in Versuch 1 und 2 zwei-zeitig appliziert, wobei die zweite Hälfte des Bolus nach ca. 100 Versuchsminuten verabreicht wurde. Bei Versuch 3 bis 9 erfolgte die Applikation des gesamten Bolus zu Beginn der Perfusion.

2.5 Versuchsablauf und Perfusionstechnik

2.5.1 Vorbereitung des Perfusionsaufbaus

Vor Versuchsbeginn wurde der Perfusionskreislauf mit erwärmter, heparinierter NaCl-Lösung (10.000 IE Heparin, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) durchspült. Danach erfolgte die Auffüllung mit dem vorbereiteten, ebenfalls erwärmten und heparinisierten Blut. Gleichzeitig wurde etwa eine Stunde vor Perfusionsstart das Dialysat in den Dialysatbehälter gefüllt und der Dialysat- und Wärmekreislauf angeschlossen. Der Perfusionsaufbau war nun bereit zum Anschluss des Darms.

2.5.2 Anschluss des Darmes an das System, Versuchsablauf

Unter kurzem Abschalten der Rollenpumpen wurde der Jejunumabschnitt über die kanülierte Arteria jejuni mit dem arteriellen und über die kanülierte Vena jejuni mit dem venösen Schenkel des Perfusionskreislaufes verbunden und sofort mit dem auf physiologische Temperatur erwärmten, oxygenierten Blut perfundiert. Auf beeindruckende Weise wandelte sich innerhalb von Sekunden die durch Ischämie provozierte livide Färbung des Darmgewebes in eine Rosigum.

Mit erster Überprüfung des Perfusionsdrucks, der mittels Rollenpumpen über den Perfusionsfluss reguliert wurde, hatte der Versuch begonnen. Über die gesamte Perfusionslänge wurde sichergestellt, dass er sich im physiologischen Referenzbereich von 80 bis 140 mmHg befand und gegebenenfalls nachreguliert. Sämtliche Parametermessungen für Versuchsminute Null konnten nun folgen.

Gleichzeitig wurde die Prüfsubstanz intraluminal verabreicht. Durch aktive Darmkontraktion, welche zur 40., 100. und 160. Minute durch Beobachtung ausgezählt wurden, gelangte dieses Ingestavolumen bis zu Perfusionsende an die aboral gelegene Seite des Darmabschnittes und wurde mittels eines Messbehälters aufgefangen. Dieser Lösung wurden ab Versuch 3 erneut Cadmiumproben entnommen. Nach Versuchsende wurden der Darm, das Perfusat und alle kontaminierten Teile in Sonderabfallbehältern speziell entsorgt.

Zur Cadmiumbestimmung wurden eine Nullprobe aus dem Blut des Schweins (vor Befüllung des Perfusionskreislaufes) sowie zur Versuchsminute 60, 120 und 180 Blut- und Dialysatproben in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg) abgenommen. Außerdem wurde der Cadmiumgehalt des Ingestavolumens zu Perfusionsende bestimmt.

Um die Qualität der Perfusionen zu sichern, wurde von Versuchsbeginn an alle 20 Minuten Blut für eine Blutgasanalyse, Heparin-Röhrchen (arteriell und venös) und EDTA-Röhrchen (arteriell) entnommen. Folgende Parameter wurden gemessen bzw. kalkuliert:

Mittlerer arterieller Perfusionsdruck (MAP), arterieller Perfusionsfluss, Organwiderstand R, maximale Ödembildung, arterielle Bluttemperatur, Sauerstoffverbrauch des Dünndarms „postprandial“, arterieller pH-Wert, arterieller Hämatokrit, arterielles freies Hämoglobin, arterieller Natriumgehalt, arterieller Kaliumgehalt, venöser Lactatgehalt, arterielles Gesamtprotein, arterielles Albumin und Glukoseverbrauch.

2.5.3 Gabe von Substanzen

Bis auf die Heparinisierung von Blut und Schlauchsystem vor Beginn des Versuches wurden dem Perfusionskreislauf keine weiteren Substanzen zugegeben. Eine ausreichende Versorgung des Darmes mit Nährstoffen erfolgte durch sein eigenes Absorptionsvermögen der intraluminal applizierten Nährlösung.

2.6 Probegewinnung und Analytik

2.6.1 Klinisch-chemische Analysen

Die Analyse der Blutproben erfolgte nach Zentrifugation im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité-Universitätsmedizin. Blutgasanalyse und Sauerstoffstatus wurden mit dem Hemoximeter OSM3 und dem ABL 505 Blutgasanalysegerät durchgeführt (beide Radiometer Copenhagen A/S, Kopenhagen, Dänemark).

2.6.2 Atom-Absorptions-Spektroskopie zur Cadmiumbestimmung

Als Nachweismethode zur Ermittlung der Cadmiumkonzentration diente die Atom-Absorptions-Spektroskopie. Auch Analysen vieler anderer Elemente, speziell Schwermetalle lassen sich mit ihr realisieren.

Durch thermische Energieeinwirkung kommt es zur Elektronenanregung und einer daraus resultierenden Energieänderung. Diese ist durch elementspezifische Absorptionslinien im elektromagnetischen Spektrum nachweisbar. Auf diese Weise wurden die Cadmiumbestimmungen bei der SOFIA GmbH, Berlin durchgeführt.

Nach Zusatz von Triton X-100 pro analysis als Solvens sowie HNO₃ Suprapur Matrix Modifizier (beides Merck KGaA, Darmstadt) zu den Blutproben werden diese zur Cadmiummessung in den Probenbehälter des Atom-Absorptionsspektroskopes gebracht. Im benutzten Spektroskop 4100 ZL (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) werden die Proben in einem Endkappen-Graphitrohr in fünf Stufen erhitzt: 110 °C bzw. 130 °C zum Trocknen der Probe, 500 °C zur Veraschung. Das Anheben in eine höhere Atomenschale erfolgt erst bei einer Temperatur von 1.500 °C. Der letzte Schritt (2.450 °C) dient dem Ausheizen zur Reinigung des Graphitrohres (Beaty, 1993).

Während der Atomisation findet eine Durchleuchtung des Graphitrohres durch eine Hohlkathodenlampe (HKL) statt. Die Kathode der Lampe jeweils mit dem zu untersuchenden Material (hier: Cadmium) beschichtet, da die Absorptionslinien einzelner Atome sehr schmal sind. Wird eine Spannung über die HKL angelegt, wandern Elektronen von der Kathode zur Anode. Die Elektronen stoßen mit den Cadmiumatomen zusammen und ionisieren diese. Durch eine Beschleunigung der nun positiv geladenen Cadmiumionen in Richtung der Kathode und deren Aufprall werden Elementatome herausgeschlagen. Diese freien Elementatome wiederum finden erneute Anregung durch Kollisionen mit den Elektronen und senden charakteristische Photonen aus (Linienspektrum für Cadmium 228,8 nm). Mit den charakteristischen Wellenlängen für das Element (gerichtetes Licht) verlassen die Photonen nun die Lampe, um nach Durchtritt durch das Graphitrohr als ungerichtetes Licht mit einer Schwächung, die proportional zur Cadmiumkonzentration in der atomisierten Probe ist, zu erscheinen. Das ankommende, geschwächte Licht wird mit einem Photomultiplier gemessen. Das Ausmaß der Lichtschwächung kann die Cadmiumkonzentration in der Probe wiedergeben. Mittels Deuteriumlampe wird letztendlich noch eine Untergrundkorrektur nach der Zeeman-Methode durchgeführt: die Probe wird zusätzlich mit einer Deuteriumlampe durchleuchtet und ausschließlich Untergrundlichtemissionen gemessen. Aus beiden Werten (Absorption durch Cadmiumkonzentration und Untergrund) kann die Cadmiummenge genau bestimmt werden.

2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel 2000 und Microsoft SPSS 11 (beides für Mac OS X) benutzt. Die graphische Darstellung wurde mit Balkendiagrammen und Box- and Whiskerplots (Abb. 4) durchgeführt. Signifikanzen wurden mit dem

U-Test nach Mann und Whitney für unverbundene Stichproben im Vergleich zwischen den Gruppen sowie mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben innerhalb der Gruppen bestimmt und sind mit einem * markiert.

Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt wird und deren innere Linie den Median repräsentiert. Ferner werden der kleinste und größte Wert markiert, sofern sie keine Ausreißer sind.

Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen (Extremwerte), werden im Boxplot mit einem Stern markiert. Werte, die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet.

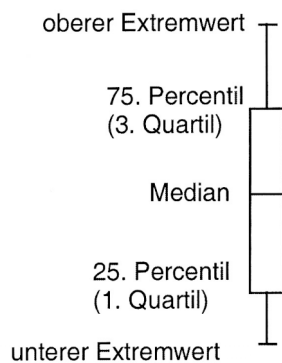


Abbildung 4: Box- und Whiskerplot