

1 Diskussion

Die Öffentlichkeit fordert schon lange eine Reduktion der Tierversuche. Auch das Tierschutzgesetz verlangt vor der Durchführung eines Tierversuchs zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren erreicht werden kann. Neben der Verringerung der Belastung der Versuchstiere während des Versuchsverlaufs (Refinement), spielen seitdem die Entwicklung und Anwendung von Alternativmethoden zur Verringerung (Reduction) oder dem Ersatz (Replacement) von Tierversuchen eine immer größere Rolle.

In der Tiermedizin gibt es eine Reihe von Fragestellungen, die bisher mit Tierversuchen bearbeitet worden sind. Dazu gehören die Erforschung der Pathogenese der Huf- und Klauenrehe. Für das Rind fehlt allerdings ein geeignetes Tiermodell, das valide Ergebnisse verspricht. Das macht den Einsatz von Tieren auch aus wissenschaftlicher Sicht fragwürdig. Im Bereich der Hufrehe des Pferdes wurden entscheidende Erkenntnisse zur Pathogenese der Hufrehe mit Hilfe von Tierversuchen gewonnen (MARKS, 1984). Andere Untersucher injizierten potentiell Rehe induzierende Substanzen und setzten unter Narkose die Hufe ab. Die Gefäße wurden erneut über Regelpumpen mit dem Gesamtorganismus verbunden, so dass man Veränderungen im Gefäßsystem aufzeichnen konnte. Nach dem Versuch wurden die Tiere euthanasiert (ROBINSON, 1975; ALLEN, 1990; EATON, 1995). Die Belastung durch Versuchstiere wurde zwar durch die Tötung ganz im Sinne des Refinements gering gehalten, dennoch sind solche Versuche ethisch sehr bedenklich. Da es heute als erwiesen gilt, dass die Rehe des Rindes nicht in allen Aspekten der des Pferdes entspricht (MÜLLING und LISCHER, 2002), besteht hier nun die Problematik, dass wieder eine große Zahl in Frage kommender Substanzen am Tier, diesmal dem Rind, getestet werden müsste, um auch die Pathogenese der Klauenrehe des Rindes zu entschlüsseln. Den Gefäßveränderungen und der Mikrozirkulation kommt nach derzeitigem Kenntnisstand eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Rehe zu. Diese Veränderungen lassen sich recht gut in isolierten Organmodellen untersuchen. Damit stellt ein Modell der isoliert perfundierten Rindergliedmaße eine sinnvolle und attraktive Alternative zum Tierversuch dar.

5.1 Entwicklung und Standardisierung des Modells

5.1.1 Adaptation an das Modell der Schweinegliedmaße

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Modell der isolierten hämoperfundierte distalen Rindergliedmaße entwickelt, standardisiert und charakterisiert werden. Als Basis diente das bereits vorhandene Modell der isoliert normotherm hämoperfundierte Schweinegliedmaße (WAGNER, 2001).

Zunächst war eine Anpassung der Apparatur, die für die Schweinegliedmaße entwickelt worden war, nötig. Die Unterschiede bestehen darin, dass die Schweinegliedmaße proximal in der Schulter abgesetzt wurde, beim Rind wurde lediglich die distale Vordergliedmaße (Hand) genutzt, die direkt distal des Handwurzelgelenkes abgetrennt wurde. Die Gefäßversorgung in diesem distalen Bereich ist weitreichender verzweigt, so dass eine andere Kanülierung zu verwenden war als beim Schwein. In der ersten Perfusion wurde nur eine der zwei Hauptarterien kanüliert, nämlich die *A. digitalis palmaris communis* III (das Schweinegliedmaßenmodell arbeitet mit der Kanülierung der einzigen Hauptarterie, der *A. brachialis*). Die zweite Arterie (*A. metacarpea dorsalis* III) war zu klein für die vorhandenen Katheter. Infolge der fehlenden Perfusion des Gefäßes kam es zu einem Druckanstieg über 150 mmHg in nur 100 Minuten. Es wurde gefolgert, dass die Kanülierung nur einer Arterie zu einer unvollständigen Versorgung der Klaue führte. Die Arterien verbinden sich vor dem Eintritt in die Klaue zur *A. interdigitalis*. In der Klaue war der Gegendruck der sich weiter aufzweigenden Gefäße größer als der Gegendruck der kanülierten Arterie. Das Perfusat nahm wahrscheinlich den leichteren Weg, so passierte nur eine geringe Menge der Perfusionsflüssigkeit die Klaue. In der zweiten Perfusion wurden beide Hauptarterien erfolgreich kanüliert. Die Gliedmaße konnte innerhalb der festgelegten Werte perfundiert werden. Aus diesem Grunde wurde darauf verzichtet auch das dritte zuführende größere Gefäß, die *A. digitalis palm. propria* III, zu kanülieren. Die warme Ischämiezeit¹ wurde dadurch wesentlich verkürzt. Die optimale Vorgehensweise für die Perfusion wäre eine

Kanülierung sämtlicher Gefäße, sowohl der zuführenden als auch der abführenden. Damit wären die physiologischen Verhältnisse am ehesten zu erzielen und eine Perfusion in physiologischer Gliedmaßenhaltung (Klaue nach unten) möglich gewesen. Die Gefäße waren jedoch sehr klein und zahlreich, die Ischämiezeiten limitierten hier die Möglichkeiten. Hinzu käme ein hoher Kostenaufwand, der bei dem erwünschten Nutzen nicht zu vertreten wäre. Die nicht kanülierten Gefäße gaben ihren Inhalt direkt in das Reservoir der Perfusionsapparatur ab. Bei Perfusion in aufrechter Position (mit der Klaue nach unten) ergoss sich das Perfusat über die Oberfläche der Rindergliedmaße. Trotz ausgiebiger Reinigung war das mit einer starken Kontamination durch Schmutz und Haare verbunden. Deshalb wurde die Perfusion mit der Klaue nach oben durchgeführt. Es sind dadurch keine Nachteile zu erwarten, da der Druck der Perfusion konstant eingeregelt wurde. Die Position der Gliedmaße und dadurch entstehende, ohnehin minimale Änderungen im hydrostatischen Druck werden daher nicht wirksam.

In den durchgeführten Versuchen betrug die warme Ischämie 10 – 15 Minuten, die kalte Ischämie² zwischen 1,5 und 2 Stunden. In beiden Zeitspannen lagen die hier verwendeten Organe in einem guten Zeitrahmen (PFEFFER, 2002). Untersuchungen an anderen Organen, etwa an Rattenlebern (IKEDA et al., 1992) zeigten, dass vier Stunden kalte Ischämie und 30 Minuten warme Ischämie bis zur Transplantation eine Überlebenszeit von mindestens 100 Tagen ermöglichen.

Bei der Verwendung von autologem Blut zur Gewinnung der gewaschenen Erythrozyten hätte sich die kalte Ischämiezeit um eine Stunde und 15 Minuten verlängert. Es wurde deshalb auf Erythrozyten heterologen Blutes zurückgegriffen, die schon vor dem Eintreffen des Organs im Labor gewaschen werden konnten.

5.1.2 Anschluss an die Apparatur und Reperfusion

Das Blut zur Nullwertbestimmung (min 0) wurde aus dem Blutreservoir unmittelbar vor Perfusionsbeginn entnommen. Eine Beeinflussung durch Reperfusion kann hier also noch nicht stattgefunden haben. Im Vergleich mit den Werten nach 30 Minuten lässt sich der Einfluss der Reperfusion ablesen. Laut PFEFFER (2002) fallen in diesem Zeitraum der pH-Wert und der Laktatgehalt ab. Die Elektrolyte würden einen Anstieg von Kalium und einen Abfall von Calcium zeigen. Der Zellschaden durch die Ischämiezeit sei dafür verantwortlich. In den eigenen Versuchen an der Rindergliedmaße konnte ein Kaliumanstieg beobachtet werden. Der Calciumgehalt und der pH- Wert fielen tendenziell leicht ab, der Laktatwert stieg jedoch kontinuierlich an.

Erste Perfusionen mit der Einstellung des Druckes auf 100 mmHg und einer resultierenden Flussrate von 230 – 250 ml/ min wurden nach dem Vorbild der Schweinegliedmaße durchgeführt (WAGNER, 2001). Es ergaben sich lichtmikroskopisch Hinweise auf eine zu starke Beeinträchtigung der Gefäße (Dilatationen der Gefäßwände, Extravasate). Die Flussrate und der Perfusionsdruck ließen sich demnach nicht direkt übernehmen. Veröffentlichungen über physiologische Werte in der Rindergliedmaße sind bis zu dem heutigen Zeitpunkt nicht bekannt. Da Rind und Pferd ein prinzipiell baugleiches und gleich dimensioniertes Gefäßsystem besitzen, wurde auf Werte aus der Literatur zum Pferdehuf zurückgegriffen. ROBINSON (1974) hat an Pferdegliedmaßen Drücke von 93 – 154 mmHg und Flüsse von 24 – 116 ml/ min gemessen. SCOTT et al. (1978) maßen Drücke von 78 – 130 mmHg und Flüsse von 25,5 – 80 ml/ min. Es war daher davon auszugehen, dass eine Flussrate von 230 ml/ min zu hoch angesetzt war.

Hinzu kam das Problem, dass die Gefäßkaliber der jeweiligen Gliedmaßen individuell sehr unterschiedlich sind. Selbst innerhalb einer Rasse und eines Alters traten Unterschiede im Durchmesser von mehreren Millimetern auf. Diese Unterschiede führten an der Perfusionsapparatur zu unterschiedlichen Flussraten bei einem standardisierten Druck von 100 mmHg, so dass eine Gliedmaße bei 150 ml/ min perfundiert worden wäre und eine andere bei 400 ml/ min. Damit wäre die für das Pferd angegebene physiologische Flussrate (24 – 116 ml/ min) bei weitem überschritten und die Möglichkeiten der Apparatur erschöpft. Deshalb wurde für weitere Perfusionen die zweite Möglichkeit, die Perfusion bei flusskonstanten Bedingungen, gewählt. Nach schrittweiser Reduktion der Flussrate auf 190

1: Die warme Ischämiezeit ist die Zeit vom Zeitpunkt des Herzstillstandes bis zur Kühlung des Organs (ADKINSON et al., 1986).

2: Die kalte Ischämie beginnt mit der Kühlung des Organs und endet mit der Reperfusion des Organs (IKEDA et al., 1992).

ml/ min ließ sich die Vitalität erhalten und es wurden physiologische Ergebnisse erzielt. Dies wurde durch die gemessenen Parameter und die morphologische Untersuchung verifiziert. Leider liegen die resultierenden Drücke nicht immer in dem für das Pferd angegebenen Bereich von 78 – 154 mmHg. Je größer der Gefäßdurchmesser ausfällt, desto geringer ist der resultierende Druck (34 – 120 mmHg).

Ein weiteres Maß für die Vitalität des Organs stellt der Organwiderstand (Perfusionsdruck/ Perfusionsfluss) dar (BARTHEL et al., 1989; BRISTOL et al., 1991). Eine Zunahme des Organwiderstandes bei konstantem Fluss sei auf eine Verengung der Gefäße zurückzuführen. Diese kann zwei Ursachen haben. Zum einen kann Blutgerinnung in den Gefäßen zu deren Verengung führen, und zum anderen kann es zu Wassereinlagerungen im Gewebe kommen (Ödembildung), was ebenfalls eine Gefäßverengung zur Folge haben kann. Da der ganze Fuß perfundiert wurde, ist eine Gefäßverengung durch Thrombenbildung im Bereich oberhalb der Klaue nicht durch die Probenentnahme nachweisbar. Ein Verschluss in diesem Bereich ist jedoch unwahrscheinlich, da die Gefäße proximal der Klaue sehr viel größere Kaliber aufweisen. Der Organwiderstand, der den Wert 1 nicht überschreiten darf (WAGNER, 2001), wurde in Perfusion 1 und 5 überschritten. Nach der 6. Perfusion wurde außer einem erhöhten Organwiderstand eine Gewichtszunahme von über 10 % gemessen und auch lichtmikroskopisch bestätigte sich ein massives Ödem. Ebenfalls erhöhte Organwiderstände ergaben sich für Perfusion 13, 14 und 15. Alle drei Versuche waren Vollblutperfusionsen mit starker Thrombenbildung. Die Ergebnisse der Perfusionsen, die mit Erythrozyten angereicherter Pufferlösung vorgenommen wurden, waren gut, so dass eine Ergründung der Ursachen und die entsprechende Behebung nicht erforderlich waren. Wollte man mit Vollblut perfundieren, müsste ein Antikoagulant während der laufenden Perfusion nachgegeben werden. Um Ödembildung zu reduzieren, wäre das Perfusionsmedium weiter zu verbessern. Ebenfalls Erfolg verspricht eine weitere Drosselung des Flusses. Die Anpassungsphase gilt als sensibler Abschnitt einer Perfusion. Wird hier die Flussrate zu schnell auf den Maximalwert eingestellt, kommt es ebenfalls zur Ödembildung. WAGNER (2001) gibt die Anpassungsphase mit einer Stunde an. Sie wäre bei anhaltenden Ödemen auf 1,5 Stunden zu verlängern.

5.1.3 Das Perfusionsmedium

In den ersten beiden Perfusionsen wurde physiologische Pufferlösung, angereichert mit 4 % bovinem Serumalbumin, als Perfusionsmedium verwendet, um die Perfusionsparameter (Perfusionsfluss und –druck, Gase und Ionenkonzentrationen) zu kontrollieren. Mit zellulären Perfusionsmedien ist ein höherer Sauerstoffpartialdruck zu erreichen (HARTIG, 1997), die Bereitschaft zur Ödembildung verringert sich (LOVE et al., 1970) und Schwankungen des Perfusionsdruckes und –flusses fallen mit zellhaltigen Medien geringer aus (LOVE et al., 1970). Deshalb wurde ab Perfusion 3 Vollelektrolytlösung mit gewaschenen Erythrozyten verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Perfusion mit diesem Medium über einen Versuchsverlauf von fünf Stunden bei vitalem Organ möglich war. Es sollte dennoch versucht werden, den physiologischen Verhältnissen in der Klaue noch näher zu kommen, eventuell noch eine weitere Verbesserung der Sauerstoffversorgung zu erzielen, um die Ödembildung weiter zu verringern.

Die Perfusionsen 13, 14, 15 und 16 wurden mit Vollblut durchgeführt. Die Perfusion mit Vollblut bedingte durch die höhere Viskosität des Mediums eine geringere Flussrate (95 ml/ min), und erforderte eine geänderte Glukoseapplikation. Die Parameter lagen alle im physiologischen Bereich. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte jedoch bei zwei von vier Perfusionsen starke Zellschäden und eine Perfusion hatte entsprechend der angewendeten Vitalitätsparameter (siehe Kapitel 4.3.4) grenzwertige Ergebnisse. Eine Verbesserung wurde nicht erreicht. Damit wurde die Vollelektrolytlösung - angereichert mit gewaschenen Erythrozyten - zum Medium der Wahl.

5.1.4 Glukoseapplikation

In den Perfusionen 3 und 5 wurde die Glukose- und Insulinapplikation nach dem Modell der Schweinegliedmaße (WAGNER, 2001) durchgeführt. Die Gabe von 2 g Glukose nach der ersten halben Stunde und 1 g Glukose nach jeder weiteren Stunde führte zu einer starken Hyperglykämie mit Werten bis zu 140 mg/ dl. Es zeigte sich zwar, dass die Rindergliedmaße nach dem Transport vom Schlachthof zum Labor einen hohen Glukosebedarf hatte, im Verlauf der Perfusion jedoch aufgrund der fehlenden Muskelmasse im Vergleich zum Schweinegliedmaßenmodell einen insgesamt geringeren Nährstoffbedarf aufwies. Eine Applikation von 2 g Glukose zur Stunde 0 und 0,25 g Glukose zur Stunde 2,5 und 3 sowie 3,5 und 4 ab Perfusion 10 wies während des gesamten Versuchszeitraumes, bis auf wenige Ausnahmen, Werte innerhalb des physiologischen Bereiches auf und konnte damit als die optimale Applikationsform für die Rindergliedmaße angesehen werden. Die Dosis der Insulinapplikation konnte vom Schweinegliedmaßenmodell übernommen werden. WAGNER (2001) hatte gezeigt, dass eine Erhöhung der Insulinkonzentration keine bessere Aufnahme der Glukose zur Folge hat, so dass hier auf weitere Versuche verzichtet wurde.

5.1.5 Begründung der Auswahl der Vitalitätsparameter

Der Einsatz des Modells setzt voraus, dass die Organvitalität im Versuchsverlauf sichergestellt ist. Mit dem Ziel diese zu beurteilen, wurde abgewogen, welche der bisher verwendeten Vitalitätsparameter für dieses Modell aussagekräftige Ergebnisse erwarten lassen.

Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung

Die lichtmikroskopische Untersuchung hat sich als empfindliche und am besten geeignete Methode für den Vitalitätsnachweis erwiesen. Es konnte durch die lichtmikroskopische Untersuchung bestätigt werden, dass Organgewichtszunahmen über 10 % (Perfusion 6 + 10) und Druckanstiege über 150 mmHg (Perfusion 6) eine Vitalität des Organs ausschließen, da sich ausgeprägte interstitielle Ödeme mit resultierenden druckbedingten Zellschäden entwickeln. In Perfusion 8 waren alle Parameter stabil. Trotzdem ergab die lichtmikroskopische Untersuchung starke postmortale Veränderungen in fast allen Regionen. Die Vollblutperfusionsen 14, 15 und 16 sind zwar bei verhältnismäßig hohen Drücken durchgeführt worden, nicht jedoch über 150 mmHg. Hier zeigte sich mikroskopisch eine starke Thrombenbildung, die offensichtlich eine Mangelversorgung zur Folge hatte. Die war nicht stark genug, um eine Druckerhöhung zu bewirken.

Wenn die Ergebnisse auch erst nach der Perfusion zu erhalten sind, so hat sich die lichtmikroskopische Untersuchung trotzdem als unverzichtbarer Vitalitätsparameter erwiesen. Die meisten Untersucher von Organmodellen nutzen diesen Nachweis nicht (ARENS, 1991; HARTIG, 1997; MERTENS, 2002; WAGNER, 2001; PFEFFER, 2002). Die Autoren geben auch keine Auskunft über die Aussagekraft in ihrem speziellen Fall. Lediglich ENGELHARDT (2003) zeigte anhand mikroskopischer Bilder den Einfluss der Perfusion auf das Organ.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung erlaubt eine Detektion noch geringerer hypoxiebedingter Schäden oder postmortalen Veränderungen anderer Ursache innerhalb der Zelle. Insbesondere die Integrität der mitochondrialen Membranen gilt als Indikator für initiale Schäden durch Hypoxie (BUDINGER, et al., 1998) Für die Etablierungsphase gab sie Aufschluss darüber, dass die lichtmikroskopische Untersuchung ausreichend sensibel ist. Insofern könnte in weiteren Experimentalphasen auf diese Untersuchung, die sehr aufwendig ist, verzichtet werden, sofern das Experiment nicht eine feinere Detektion erfordert. Da der zu beurteilende Gewebeabschnitt bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung extrem klein ist, wird die Übersichtlichkeit erheblich eingeschränkt.

Kalium

Laut WAGNER (2001) bedeutete eine Kaliumerhöhung auf 5 mmol/ l bei Ausschluss einer verstärkten Hämolyse den Organtod. Kalium gilt grundsätzlich als sehr sensitiver Parameter zur Detektion von Zellschäden in einem frühen Stadium, da die Natrium-Kalium-Pumpen vergleichsweise frühzeitig versagen und dadurch der extrazelluläre Kaliumwert ansteigt. Die Rindergliedmaße erreichte in keiner Perfusion Kaliumwerte über 5 mmol/ l. Da in der

lichtmikroskopischen Untersuchung Klauen als organisch tot beurteilt wurden deren Kaliumwerte im Normbereich lagen, ist dieser Parameter für die Rindergliedmaße nicht sensibel genug. Der Grund könnte das geringe Zellmaterial im Vergleich zur muskelhaltigen vollständigen Vordergliedmaße des Schweins darstellen. Es degenerieren in diesem Fall zu wenige Zellen, so dass ein starker Verdünnungseffekt die Erhöhung der Kaliumkonzentration verbirgt. Hinzu kommt, dass WAGNER (2001) Vollblut als Perfusionsmedium verwendet hat. Durch das Kalium enthaltende Blutserum startete die Perfusion mit einem höheren Basiswert und durch die nicht zu vermeidende leichte Hämolyse, verursacht von den Rollenpumpen, wurde zusätzlich das in den Erythrozyten enthaltene Kalium frei. Die Kaliumwerte während der Rinderbeinperfusionsen 3, 6, 8, 10, 14, 15 und 16, deren mikroskopisches Bild starke Degenerationen zeigte, sind nicht höher gestiegen als während der Perfusion der anderen Gliedmaßen. Bei Perfusion 14, 15 und 16 handelte es sich ebenfalls um Vollblutperfusionsen. Dieser Parameter ist deshalb zur Beurteilung der realen Zellschädigung für dieses Modell nicht geeignet. Vielmehr sei dafür plädiert, auch für andere Organmodelle diesen Parameter durch eine lichtmikroskopische Untersuchung auf seine Zuverlässigkeit zu testen, da das Organ- Perfusat-Verhältnis im Modell der Rindergliedmaße - verglichen mit vielen der anderen Modelle - nicht außergewöhnlich weit ist.

LDH

Die Erhöhung dieses Enzyms weist auf eine Schädigung von Zellmembranen hin, da es unter physiologischen Gegebenheiten extrazellulär nicht vorkommt. In Modellsystemen mit azellulären Perfusionsmedien liefert eine Bestimmung der LDH – Konzentration zuverlässige Ergebnisse (HARTIG, 1997). Bei der Hämolyse ist die LDH jedoch ebenfalls erhöht (SCHREY, 2000; KRAFT und DÜRR, 1999), so dass bei der Verwendung von Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten die durch die Rollenpumpen verursachte leichte Hämolyse die Ergebnisse verfälscht. Die Aussagekraft des Parameters im Hinblick auf die Zellintegrität ist somit eingeschränkt. Deshalb wurde auf diesen Parameter verzichtet.

Laktat (Laktat-Pyruvat-Quotient)

Die Laktatkonzentration im Perfusat ist ein weiterer Parameter, der zur Beurteilung der Stoffwechsellage herangezogen werden kann. Dabei handelt es sich um das Endprodukt der anaeroben Glykolyse, d.h. es wird hauptsächlich in Abwesenheit von Sauerstoff gebildet (BONEN et al., 1994). Auch DIETZE et al. (1977), die entsprechende Untersuchungen am menschlichen Unterarm durchführten, zeigten, dass die Laktatkonzentration unter hypoxischen Bedingungen ansteigt. Lichtmikroskopisch sollte die Laktatazidose durch Zelldegeneration sichtbar sein. Elektronenmikroskopisch wären besonders die Integrität der Mitochondrien zu beurteilen. BUDINGER et al. (1998) bewerten die Mitochondrien als empfindliche Sensoren für die Sauerstoffversorgung des Gewebes. Hypoxie führt zu einer sichtbaren Abnahme der Mitochondriencristae (EKEREN et al., 1992).

Im dem elektronenmikroskopisch untersuchten Gewebe perfundierter Klauen sind die Mitochondrien in den meisten Fällen ultrastrukturell intakt, obwohl die Laktatkonzentration innerhalb der Perfusion stark angestiegen ist. Genauere Bestimmung, ob das Laktat aus einer anaeroben Stoffwechsellage stammt, ist durch den Laktat-Pyruvat-Quotienten zu erreichen (NEILL et al., 1969). Ein Abfall der Sauerstoffversorgung des Gewebes, etwa durch Hypoxie, Ischämie oder Anämie bewirkt unmittelbar einen Anstieg des Laktat-Pyruvat-Quotienten, da die Glukose hauptsächlich zu Laktat verstoffwechselt wird. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat zu Acetyl Co A oxidiert (ausgenommen in ausgereiften Erythrozyten). Das Verhältnis wäre dann zugunsten des Pyruvats verschoben. Die Pyruvatkonzentration ist ebenfalls während der Perfusion stark angestiegen, demnach zeigt Quotient durchgehend physiologische Werte.

Die Laktatkonzentration wird neben der Stoffwechsellage der Gliedmaße noch von anderen Faktoren beeinflusst. Die Blutzellen, die vor ihrem Einsatz bis zu einer Woche unter anaeroben Bedingungen gelagert wurden, sind möglicherweise nicht mehr in der Lage nach der Oxygenierung ausreichend schnell auf einen aeroben Stoffwechsel umzuschalten (BRAUN, 2002). Auch andere Autoren beschreiben einen moderaten Anstieg der Laktatkonzentration im Perfusat von isolierten Organen, die mit einem bluthaltigen Medium perfundiert werden (TOJO et al., 1972; ADHAM et al., 1997).

Dies würde bedeuten, dass der Laktat - Pyruvat –Quotient für das vorliegende Modell nicht als Kriterium der Stoffwechsellage herangezogen werden kann. Des weiteren beinhaltet der Nachweis des Pyruvats eine große Fehlerquelle, denn dieses Stoffwechselprodukt wird im Blut sehr schnell enzymatisch abgebaut.

Da die Werte des Quotienten immer im physiologischen Bereich lagen und die elektronenmikroskopischen Proben keine Hinweise auf hypoxische Schäden gaben, ist davon auszugehen, dass das Bein kein Sauerstoffdefizit während der Perfusion aufwies ist. Deshalb wurde ab Perfusion 11 auf eine Bestimmung dieses Parameters verzichtet.

Glukoseverbrauch

Der Nachweis des Verbrauchs der zugegebenen Glukose ist ein zuverlässiger Indikator für die Lebensfähigkeit des Organs (CARVER et al., 1986; RIEVIERE et al., 1987; BRAUN, 2002; BÄUMER, 2002). WAGNER (2001) hat nicht den Verbrauch im Blut gemessen, sondern die Glykogenspeicher der Muskulatur vor und nach der Perfusion mittels elektronenmikroskopischer Bilder verglichen. Ein Abbau galt als Indikator für den Glukoseverbrauch der Gliedmaße. Für das Modell der Rindergliedmaße ist der Glukoseverbrauch jedoch kaum relevant. Die Gliedmaße wurde viel weiter distal (unmittelbar distal des Handwurzelgelenkes) abgesetzt, da der entscheidende Organteil die Klaue war und die Größe der gesamten Gliedmaße die Kapazität der Apparatur überschritten hätte. Es ist keine Muskulatur und nur ein sehr geringes Volumen an stoffwechselaktiven Gewebe im Verhältnis zum Gesamtvolumen des Organs und des Perfusats vorhanden. Das ist auch der Grund für den insgesamt sehr geringen Verbrauch an Glukose im Vergleich zu anderen Organmodellen. Eine Messung wäre daher sehr ungenau.

Laktat-Glukose-Verhältnis

Das Laktat - Glukose – Verhältnis gibt ebenfalls Auskunft über die Stoffwechsellage des Organs (MONTEIRO und REVIERE, 1990; MAASS, 1992; MERTENS, 2001). Ein Verhältnis von unter 2 weist auf aerobe Bedingungen hin. Ein Schwachpunkt ist jedoch, dass das Verhältnis auch unter 2 bleibt, wenn gar kein Stoffwechsel stattfindet. Dieser Parameter ist nur sicher zu verwenden, wenn gleichzeitig der Glukoseverbrauch gemessen wird, bzw. überhaupt ein messbarer Glukoseverbrauch vorliegt.

Farbstoffinjektionen und Thermographie

Eine intraarterielle Injektion z.B. von Trypanblau am Ende des Versuchs dient als Indikator für ischämische Bezirke. Die Verwendung von Farbinjektionen hätte die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung beeinträchtigt. Da diese die sensibleren Methoden zur Darstellung von vitalem Gewebe bzw. degenerativen Prozessen sind, wurde auf die Farbinjektionen verzichtet. Stattdessen wurde mit Hilfe einer Thermokamera nach ischämischen Bezirken, in diesem Fall sogenannte „cold spots“ gesucht. Die Thermokamera ermöglichte eine Messung der Wärmeabstrahlung (elektromagnetischen Strahlung) und damit die Ermittlung der Oberflächentemperatur der Klaue. Da die Klaue nach dem Transport ins Labor stark herunter gekühlt war, konnte während der Perfusion die Erwärmung der Klaue dargestellt werden. Die Temperatur steigt gleichmäßig am Fuß von proximal (vom Einlauf der Perfusionsflüssigkeit) nach distal an. An der Klaue fällt auf, dass der mittlere Wandbereich in den ersten Stunden kühler bleibt als die Klauenspitze. Bei der Betrachtung des arteriellen Gefäßsystems wird deutlich, warum das so ist. Die arterielle Versorgung ist hier geringer. Das Hauptgefäß in diesem Bereich, der Arcus terminalis, verläuft innerhalb des Klauenbeins und gibt nur dorsale Äste für den Kronsaumbereich nach außen ebenso wie im distalen Wandsegment. Erst wenn der venöse Abfluss, der netzartig aus allen Segmenten Zulauf hat, die angestrebte Temperatur erreicht hat, erfolgt die Erwärmung der Wand gleichmäßig. Alle drei thermographisch erfassten Gliedmaßen zeigten eine der Klauenmorphologie entsprechende Erwärmung der Oberfläche. Die Oberflächentemperatur der Klaue war am Ende der Perfusion nicht bei allen drei Gliedmaßen gleich. Gründe hierfür sind die variierende Dicke der Hornkapsel und die unterschiedliche Umgebungstemperatur. Entscheidend für die Beurteilung der physiologischen Perfusion ist die bilateral symmetrische gleichmäßig fortschreitende Erwärmung der Klauen.

Sauerstoffverbrauch

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs stellt ein ähnliches Problem wie die Messung des Glukoseverbrauchs dar. Haut und Knochen benötigen weit weniger Sauerstoff für den Erhalt als Muskulatur. Die Messlogistik müsste sehr fein sein und die Perfusion müsste in einem eigenen Luftsystem stattfinden. Da genug andere Vitalitätsparameter zur Verfügung stehen, wurde auf die Messung des Sauerstoffverbrauchs verzichtet.

Funktionstests

Die Funktion eines Organs lässt sich meist durch klinisch verwendete Parameter nachweisen. Die Vitalität des isoliert perfundierten Herzens zum Beispiel kann mittels EKG – Kontrolle während des Versuchs sichergestellt werden. Bei Auftreten einer Ischämie fehlt in dem entsprechenden Areal eine Erregungsbildung, was zu typischen Signalen im EKG führt (AST et al., 2002). Für die Klaue könnte man die Verringerung der Elastizität des Klauenbeinträgers als Funktionsparameter verwenden. MAIERL et al. (2002) testeten seine Reißfestigkeit an Gewebeproben aus der Klaue. Die physiologische Breite der Werte ist jedoch für dieses Modell zu weit. Die zu erwartende Veränderung der Elastizität innerhalb von fünf Stunden ist zu gering. Es gibt demnach zur Zeit keine validen Funktionstests für die isoliert perfundierte Klaue.

Gewichtszunahme des Organs

Die Veränderung des Organgewichts im Versuchsverlauf gibt Auskunft über den Grad der Ödematisierung des Gewebes. Die Natrium – Kalium – Pumpen sind für den Transport von Natrium und Kalium aus bzw. in die Zellen verantwortlich. Sie reagieren sehr anfällig auf äußere Noxen wie etwa Sauerstoffmangel. Durch eine eingeschränkte Pumpenaktivität reichert sich Natrium in den Zellen an. Da Natrium Wasser bindet, kommt es unweigerlich zu einem Zellödem.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Organgewichtsänderungen während der Perfusion und der lichtmikroskopischen Untersuchung fällt auf, dass die Lichtmikroskopie die empfindlichere Nachweismethode darstellt, so dass weitere Untersuchungen auf Vitalität bei Organzunahmen über 10 % vom Ausgangsgewicht entbehrlich sind. Das Gewebe kann als organisch tot beurteilt werden. Dennoch dürfen die anderen Ödemursachen nicht außer Acht gelassen werden, um diese gegebenenfalls beseitigen zu können. Bei optimal bewertetem Perfusionsmedium kann es trotzdem zu Thrombenbildung kommen, evtl. beschränkt auf spezielle Bezirke. Die Abflussstörung führt sekundär zur Druckatrophie und deshalb ebenfalls zum Zelltod. Dieses Phänomen scheint besonders im Wandsegment der Klaue gehäuft aufzutreten. Hier gibt es keine Unterhaut, die Lederhaut liegt dem Klauenbein direkt auf und oberflächlich wird das Wandsegment vom sehr harten Hornschuh begrenzt. Eine Ansammlung von Gewebewasser in der Lederhaut hat deshalb eine direkte Komprimierung der Zellen zur Folge. Bei anhaltendem Druck kommt es zur Druckatrophie. Erschwerend hinzu kommt das Fehlen von kollateralen Blutgefäßen im Blättchenapparat der Klaue (HIRSCHBERG et al., 1999).

Einige Gliedmaßen wiesen ein geringeres Organgewicht als am Anfang der Perfusion auf. Das ergibt sich daraus, dass die Gliedmaße vor dem Anschluss an die Apparatur noch einmal durchgespült wurde. Es floss nicht immer die gleiche Menge Spülflüssigkeit wieder aus dem Organ heraus. Die im Organ verbleibende Flüssigkeit wurde mitgewogen und floss dann nach dem Anschluss an die Apparatur wieder heraus, so dass sie nach der Perfusion nicht mehr mitgewogen wurde.

5.1.6 In vivo und in vitro – die Unterschiede

Die Akzeptanz einer Alternativmethode als Ersatz bzw. Ergänzung für den Tierversuch hängt letztlich davon ab, ob das in vivo Ergebnis mit ausreichender Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit vorhergesagt werden kann. Am ehesten zu gewährleisten wäre dies, indem das Modell vollständig der physiologischen Situation im Körper entspräche. Trotz aller modernen technischen Möglichkeiten unserer Zeit ist dies immer noch nicht möglich. Es mussten Kompromisse geschlossen werden, zwischen der von der Natur vorgegebenen physiologischen Situation, der Möglichkeit der Technik und der verfügbaren Zeit. Auch die Art der Fragestellung kann für die Kompromissfindung von entscheidender Bedeutung sein.

Die Ionenkonzentrationen, der pH – Wert, die Glukosekonzentration und die Blutgase konnten der physiologischen Situation nachempfunden werden. Lediglich Kalium blieb unter der physiologischen Grenze.

Bei der Kanülierung des Gefäßsystems im Schlachthof fiel auf, dass die Gefäße stark kontrahiert waren. Mit Beginn der Spülung dilatierten sie. Der Basistonus ist mit dem Abtrennen der Gliedmaße unterbrochen. Das Zusammenspiel von Sympathikus (Noradrenalin) und Parasympathicus (NO) gleicht den durch die Spüllösung ausgeübten Druck nicht aus. Dieses Defizit lässt sich nur schwer beseitigen. Insbesondere bei der Untersuchung von Vasodilatoren ist ein Basistonus unerlässlich. In Perfusion 32 wurde die Gefäßreaktivität durch Substitution von Noradrenalin getestet. Es stellte sich heraus, dass die Rindergliedmaße für eine durch Druckerhöhung ablesbare Kontraktion der Gefäße die 10 Fache Menge an Noradrenalin als die Schweinegliedmaße benötigt. Die Erklärung dafür ist sicherlich in dem Gesamtdurchmesser der Gefäße zu suchen. Die Schweinegliedmaße beinhaltet die Vorderschinkenmuskulatur, die eine hohe Gefäßdichte aufweist. Mit der Kontraktion der Gefäße verändert sich der Gesamtdurchmesser im Modell der Schweinegliedmaße um ein Vielfaches mehr als im Modell der Rindergliedmaße. Damit wird die Reaktion durch eine Druckerhöhung unmittelbar sichtbar.

Diese Druckerhöhung wurde für die Testung von Vasodilatoren ausgenutzt. Noradrenalin wurde, aufgrund seiner kurzen Wirksamkeit, kontinuierlich per Infusion substituiert und erwirkte dadurch eine Basiskontraktion. Trotzdem erreicht das System nicht die physiologische Situation, so dass bei der Verabreichung der vasoaktiven Substanzen immer wieder eine Dosisangleichung der in Tierversuchen angegebenen Werte stattfinden musste. Die Flussrate wurde für die distale Pferdegliedmaße mit 24 – 116 ml/ min in der Literatur angegeben (SCOTT et al., 1978; ROBINSON, 1974). Die Werte für den Perfusionsdruck seien 78 – 116 mmHg. Der Versuch, beide Parameter im physiologischen Bereich zu halten, misslang. Auch hier wurde ein Kompromiss eingegangen. Der Perfusionsfluss wurde standardisiert mit 190 ml/ min eingestellt. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte bei dieser Flussrate keine stressbedingten Veränderungen der Gefäße mehr, obwohl die physiologischen Werte noch überschritten wurden. Der Druck fiel bei dieser Einstellung in einigen Perfusionen unter die physiologische Grenze von ca. 70 mmHg. Wäre die Flussrate noch weiter gesenkt worden, hätte die Gefahr bestanden, dass der ausgeübte Druck zu gering ausgefallen wäre, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Die unterschiedliche Größe der Gefäßkaliber erforderte einen zweiten Schwellenwert. Es musste nach der Adaptationsphase ein Druck von mindestens 30 mmHg herrschen. Ansonsten war davon auszugehen, dass die nötige Sauerstoffsättigung nicht erreicht wurde. Da die Vollblutperfusionen bei einem Fluss von 95 ml/ min durchgeführt worden waren und trotzdem Drücke von mindestens 80 mmHg nach einer Stunde resultierten, ist das Problem sehr wahrscheinlich in dem verwendeten Perfusionsmedium zu suchen. Aus bereits erläuterten Gründen erwiesen sich die leicht von der physiologischen Situation abweichenden Fluss - und Druckwerte also als der kleinere Nachteil. Es kann letztendlich nur von einer Näherung an die physiologische Situation in vivo gesprochen werden. Dementsprechend muss vor der experimentellen Anwendung geprüft werden, ob das Modell der jeweiligen Fragestellung gerecht werden kann.

5.2 Entwicklung des Modells

Der hier präsentierte Aufbau bietet den Vorteil einer ständigen und leichten Zugänglichkeit des Organs. Messungen können problemlos durchgeführt werden. Die Einzelkomponenten arbeiten zuverlässig und sind gut zu bedienen. Eine Zerlegung des apparativen Aufbaus für die Reinigung und Resterilisation ist schnell und einfach möglich, die Wiederverwertbarkeit vieler Baukomponenten ist damit gegeben.

Zusammenfassung der determinierten Parameter

Es ist gelungen Perfusionen unter Standardbedingungen reproduzierbar durchzuführen. Verwendet wird eine Rinderextremität, abgesetzt direkt distal des Handwurzelgelenkes, kanüliert über die A. digitalis palmaris com. III und die A. metacarpea dorsalis III. Die kalte

Ischämiezeit der Extremität darf höchstens 3,5 Stunden +/- 0,5 betragen. Die Energiebereitstellung während des Versuchsverlaufs kann durch die Applikation von 2 g Glukose zur Stunde 0 und je 0,25g Glukose zur Stunde 2,5 und 3 sowie 3,5 und 4 realisiert werden. Insulin wird zur Stunde 0,5 und 3,5 zugegeben. Wie sich im Vergleich der Versuchsgruppen zeigte, konnte durch die Senkung des Perfusionsflusses auf 190 ml/ min die Vitalität des Gewebes verbessert werden. Dies zeigte sich anhand der lichtmikroskopischen Kontrolluntersuchungen. Zu Beginn der Perfusion wird der Fluss bis zu einem resultierenden Druck von 50 mmHg eingestellt. Sollte der Druck unter 50 mmHg stagnieren, darf der Fluss nicht über 80 ml/ min gestartet werden. Innerhalb der ersten Stunde wird der Fluss langsam auf 190 ml/ min erhöht. Diese Einstellungen zeigten die besten Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf entstehende Ödeme. Zur Stunde 1 kann dann die experimentelle Phase beginnen. Die Gewichtszunahmen im Versuchsverlauf konnten fast immer unterhalb des in der Literatur angegebenen kritischen Werts von 10 % gehalten werden. Der Laktat – Pyruvat – Quotient lag immer im physiologischen Bereich, obwohl die Laktatwerte auf eine anaerobe Stoffwechsellage hingedeutet hätten. Die ebenfalls kontinuierlich steigende Pyruvatkonzentration lässt also den Schluss zu, dass hier die Herstellung einer aeroben Stoffwechsellage gelungen ist. Ob durch einen höheren Hämatokrit eventuell diese Stoffwechsellage noch verbessert werden könnte, ließ sich leider nicht klären, da die außerordentliche Aggregationsneigung des Rinderblutes die Nutzung von Vollblut als Perfusionsmedium ausschloss. WAGNER (2001) und HOBBAHN et al. (1985) meinen, Pyridoxalpolyhämoglobinlösung sei ein effektiver Ersatz für Erythrozyten. Ebenso könnte durch eine zusätzliche Applikation von Antikoagulantien die einsetzende Blutgerinnung möglicherweise reduziert werden. Diese Verbesserungsmöglichkeiten könnten in weiterführenden Versuchen getestet werden.

Das Perfusionsmedium ist eine Vollelektrolytlösung, angereichert mit gewaschenen Erythrozyten, wodurch sich ein Hämatokrit von 8 – 10 % einstellt und durch Geschwindigkeitsänderungen der Rollenpumpen konstant gehalten werden kann.

Die Versuchszeit wurde auf maximal 5 Stunden festgelegt. Längere Versuchszeiten können die uneingeschränkte Vitalität des Organs, gemessen an den licht- und elektronenmikroskopischen Ergebnissen, nicht gewährleisten. Zur Stunde 0 und dann in halbstündigen Abständen werden Proben aus dem Dialysat und Perfusat (bei Bedarf auch arteriell möglich) zur Kontrolle der Ionenkonzentrationen, des pH – Wertes, des Hämatokrit und des Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrucks, bzw. der Sauerstoffsättigung entnommen. Zur Stunde 0,5 und 2, sowie 3,5 und 5 werden Proben aus dem Dialysat entnommen, um die Glukosekonzentration zu kontrollieren. Der Perfusionsdruck und -fluss werden während des Versuches alle 5 Minuten aufgezeichnet.

Sollte während einer Perfusion der Druck unter 30 mmHg sinken oder über 135 mmHg (Sicherheitsspanne zu 150 mmHg) steigen, ist der Versuch abzubrechen. Bei Organzunahmen von über 10 % vom Ausgangsgewicht sind, sofern die Fragestellung es nicht erfordert, als fehlgeschlagen zu betrachten. Nach jeder Perfusion ist durch eine lichtmikroskopische Untersuchung sicherzustellen, dass die Gliedmaße während der gesamten Versuchsdauer vital war. Um zusätzlich den Organzustand der Klaue vor der Perfusion darzustellen, ohne die Klaue dadurch zu beschädigen, wäre eine lichtmikroskopische Untersuchung der anderen Vordergliedmaße denkbar. Das könnte für die Verifizierung durch das Experiment hervorgerufener Veränderungen interessant sein.

Die Standardarbeitsanweisung (SOP, siehe Kapitel 9.2)

Zur Regelung einheitlicher standardisierter Verfahren bei der Durchführung von klinischen Studien ist die Erstellung einer Standardarbeitsanweisung vorgesehen. Sie beschreibt die Anforderungen an die Spendertiere und den Vorgang der Organ- und Blutgewinnung sowie die Durchführung der normothermen Perfusion isolierter Vorderextremitäten des Rindes. Die SOP umfasst alle Tätigkeiten von der Gewinnung der Extremität, Vorbereitung des apparativen Aufbaus, Anschluss des Organs an das System bis hin zum Erreichen hämodynamischer Bedingungen. Sie wurde als Anhang dieser Arbeit angefügt.

5.3 Experimentelle Anwendung

5.3.1 Perfusion unter Sauerstoffdefizit

Wenn man von der gängigen Theorie aus den Lehrbüchern ausgeht, so steht am Anfang einer Reheerkrankung eine Konstriktion der Arteriolen, die zu einer Verlangsamung des Blutstroms im nachgeschalteten Kapillargebiet führt, sowie einer Weitstellung der Blut- und Lymphkapillaren der Zotten und der Blättchen der Wandlederhaut (DIRKSEN, 1985, 2002; LISCHER und OSSENT, 1994; LOGUE, 1995). Das Resultat sei unter anderem eine Gewebhypoxie. Dieser hypoxische Zustand wurde hier experimentell induziert und die Effekte der Sauerstoffunterversorgung auf die Klaue untersucht.

In der Literatur gab es keine detaillierten Angaben über den Sauerstoffbedarf der Klaue, deshalb wurde mit einer Reduktion der externen Begasung um 50 % begonnen. Während der gesamten Perfusion sank die Sauerstoffsättigung zu keiner Zeit unter 100 %. Offensichtlich ist der Sauerstoffbedarf der Klaue sehr gering, denn auch der Verzicht auf eine externe Sauerstoffbegasung hatte nur einen Abfall der Sauerstoffsättigung auf 70 – 60 % zur Folge. Eine Perfusion mit einer Sauerstoffsättigung zwischen 20 – 10 % konnte nur durch den Umbau der Apparatur erreicht werden, so dass die Sauerstoffaufnahme aus der Umgebungsluft zum überwiegenden Teil verhindert wurde. Der Sauerstoffverbrauch konnte jetzt visuell wahrgenommen werden, da sich das Dialysat von einem hellen arteriellen Rot in ein dunkles Rot färbte. Weitere Folgen waren der Abfall des pH- Wertes, er konnte ohne externe Sauerstoffbegasung nicht reguliert werden, doch es ist davon auszugehen, dass unter in vivo Bedingungen ebenfalls eine Azidose resultieren könnte. Das Gewebe sollte auf anaerobe Glykolyse umgestellt werden, was bei ansteigendem Laktat Spiegel, einen höheren Glukoseverbrauch für die gleiche Menge ATP zur Folge hat. Beides ist auch im Modell messbar gewesen. Nach SINGH et al. (1994), NOCEK (1997) und CHRISTMANN et al. (2002) sind die weiteren Folgen Lymphstau, Ödembildung und zirkumskripte Nekrosen. Das Organgewicht der Perfusion 36 zeigte schon durch die Gewichtszunahme von > 10 % ein Ödem an, dass jedoch nicht von einem perfusionsbedingten Ödem abzugrenzen ist. Perfusion 25 und 24 hatten dagegen Gewichtszunahmen von unter 1 %, in der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigte sich dennoch ein Ödem. Die von DIRKSEN et al. (2002) beschriebene Lockerung des Zusammenhalts zwischen Dermis und Epidermis konnte nicht beobachtet werden. Auch eine Veränderung der Basalzellen in eine eher isoprismatische Form konnte nicht gezeigt werden.

5.3.2 Perfusion mit reduzierter Flussrate

Mit der Reduktion der Flussrate soll die Verlangsamung des Blutstroms im Bereich des nachgeschalteten Kapillargebietes der kontrahierten Arteriolen simuliert werden. Es konnten während der Perfusion keine messbaren Veränderungen festgestellt werden. Die lichtmikroskopische Untersuchung lies kein Muster erkennen, dass die Reduktion von 50 % einen weniger starken Einfluss hätte als eine Reduktion auf 25 %. Insgesamt hatte sich die Flussreduktion stark negativ auf die Vitalität des Gewebes ausgewirkt, stärker als die Reduktion der Sauerstoffsättigung.

5.3.3 Perfusion unter Noradrenalinzugabe

Diese Perfusion wurde zur Abklärung einer gefäßreaktiven Potenz der isoliert perfundierten Rindergliedmaße durchgeführt. Es war bekannt, dass die Applikation von 0,02 µg intraarteriell bei dem Modell der isoliert perfundierten Schweinegliedmaße (WAGNER, 2001) eine signifikante Druckerhöhung provoziert hatte. Die Rindergliedmaße benötigte für eine durch Druckerhöhung ablesbare Kontraktion der Gefäße die 10 fache Menge. Wie schon in 5.1.6 erörtert, weist die Schweinegliedmaße erheblich mehr Muskulatur auf, die sich durch eine ausgesprochen hohe Gefäßdichte auszeichnet. Der Gesamtdurchmesser der Gefäße ist damit um ein Vielfaches höher als im Modell der isoliert perfundierten Rindergliedmaße, so dass eine Reaktion der Gefäße wesentlich eher als Druckerhöhung/ -abfall ablesbar ist. Ab einer Zugabe von 0,2 µg ist dennoch eine Druckerhöhung ablesbar und die Potenz des Modells damit nachgewiesen. Eine Zugabe von 2 µg zeigte einen vergleichbaren Druckanstieg, während eine Zugabe von 0,1 µg nur etwa die Hälfte des Druckanstiegs provozierte. Es ist davon auszugehen, dass ab 0,2 µg eine Sättigung der Rezeptoren stattgefunden hat. Durch die kurze Wirksamkeit konnte die Zugabe wiederholt werden. Die

Druckerhöhung war reproduzierbar. Auf eine zweite Perfusion mit dieser Fragestellung wurde deshalb verzichtet.

Die Perfusion wurde bei einem Fluss von 125 ml/ min durchgeführt, da der Perfusionsdruck sonst über 150 mmHg gestiegen wäre. Da in diesem Fall die Fragestellung lediglich die Potenz der Gefäßwirksamkeit klären sollte, wurde die Gliedmaße trotzdem verwendet. Die lichtmikroskopische Untersuchung hat in diesem Fall jedoch nur bedingt Aussagekraft, da druckbedingte Schäden auftreten.

5.3.4 Perfusion unter Histaminzugabe

Für initialen Gefäßveränderungen bei der Klauenrehe wird von den meisten Autoren Histamin eine entscheidende Rolle zugesprochen (NILSSON, 1963; DIRKSEN, 1985). Es wirkt peripher vasokonstriktisch, auf Kapillaren jedoch dilatierend und permeabilitätssteigernd (ASCHENBACH und GABEL, 2000; LÖSCHER et al., 1996; DIRKSEN, 1985; SANDFORD, 1963; RODWELL et al., 1953; CHAVANCE, 1946). Bereits NILSSON (1963) hat Histaminkonzentrationen im Blut an akut und chronisch Rehe erkrankter Rinder gemessen. Anhand seiner Arbeiten wurde die Dosis bestimmt, die der isoliert perfundierten Rindergliedmaße verabreicht wurde. Die resultierende Druckerhöhung war so massiv, dass die Kapazität der Apparatur erschöpft wurde. In den weiteren Perfusionen wurde daher ein langsamer Anstieg der Konzentration im Blut simuliert. Es konnten alle Wirkungen des Histamins gezeigt werden. Die Applikation von Histamin führt zu einer Erhöhung des Perfusionsdruckes und einer Schwellung und Rötung der Gliedmaße. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte insbesondere kontrahierte Arterien und Arteriolen, wobei das Kapillargebiet eher dilatiert war. Das Gewebe war ödematös verändert, wobei die Zellen trotz massiver Gewichtszunahmen noch ausgesprochen vital erschienen. Die von DIRKSEN et al. (2002) beschriebene Lockerung des Zusammenhalts zwischen Dermis und Epidermis konnte nicht beobachtet werden, möglicher Weise wäre dafür eine längere Versuchsdauer nötig gewesen. Auch eine Veränderung der Basalzellen in eine eher isoprismatische Form konnte nicht gezeigt werden. Dieses Bild erinnert an das klinische Bild der akuten Hufrehe, die akute Verlaufsform Rehe findet sich beim Rind jedoch sehr selten.

5.3.5 Perfusion unter Endotoxinzugabe

Das Endotoxin 055: B5 von *E. coli* wirkt in der Kreislaufperipherie über Alpha-Rezeptoren neurohumeral vasokonstriktisch und aktiviert das Blutgerinnungssystem (BOOSMANN et al., 1991a). In den drei Versuchen zeigte sich 1,5 Stunden nach Applikationsbeginn ein Druckanstieg, der langsam bis zum Ende des Versuchs anhielt. Synchron dazu fiel der pH – Wert ab. Lichtmikroskopisch gab es jedoch keine Hinweise auf endotoxinbedingte Veränderungen. Eventuell wäre auch hier eine längere Versuchsdauer nötig gewesen, um die Auswirkungen hervorbringen zu können.

5.3.6 Perfusion unter Laktatzugabe

Im Zustand der Gewebehypoxie aufgrund einer Konstriktion der vorgeschalteten Arteriolen kommt es zwangsläufig zu einer Azidose, da sich die Zellen in diesem Zustand auf ATP-Gewinnung durch anaerobe Glykolyse umstellen (VOET und VOET, 1994). Das Endprodukt dieser anaeroben Glykolyse ist Laktat. Neben dieser pH-Wert- Absenkung wird Laktat nun auch noch eine dilatative Gefäßwirkung zugesprochen (MORI et al., 1997; TRABOLD et al., 2003). In zwei Versuchen sollte diese Wirkung überprüft werden und gegebenenfalls einen Zusammenhang zur Reheentwicklung ergeben. Die Zugabe von Laktat zeigte einen pH-Wert- Abfall auf 7, hatte jedoch keinerlei Wirkung auf den Perfusionsdruck. Die lichtmikroskopische Untersuchung ergab keine Auffälligkeiten.

5.3.7 Perfusion unter Laktat- und Noradrenalinzugabe

Während der Spülung des Gefäßsystems im Schlachthof wird eine Erschlaffung der großen Gefäße sichtbar. Eine Dauertropfinfusion mit Noradrenalin sollte in weiteren zwei Versuchen unter Laktatzugabe eine Präkontraktion/ Basistonus der Gefäße sicherstellen, so dass eine Gefäßerweiterung in der Theorie möglich wäre. Es zeigte sich jedoch wiederum keinerlei Wirkung auf den Perfusionsdruck. Die lichtmikroskopische Untersuchung ergab keine Auffälligkeiten.

5.3.8 Ausblick auf eine Anwendung an der Pferdegliedmaße für Hufreheexperimente

Es hat sich gezeigt, dass die isoliert perfundierte Rindergliedmaße insbesondere für Untersuchungen zur Gefäßkontraktion und zur Darstellung der daraus resultierenden Perfusionsstörungen und Gewebeschäden sehr gut geeignet ist. Diese spielt eine zentrale Rolle in der Initialphase der akuten Hufrehe. Eine Standardisierung und Charakterisierung erfordert weniger Änderungen im Vergleich zum Modell der isoliert perfundierten Schweinegliedmaße, da die Morphologie von Pferde- und Rindergliedmaße wesentlich mehr Ähnlichkeiten aufweist. Eine Testung potentiell reheinduzierender Substanzen wäre denkbar, ohne dafür auf Tierversuchsmodelle zurückgreifen zu müssen.

5.4 Resumée

Es ist gelungen das Organmodell der isoliert perfundierten distalen Rindergliedmaße zu entwickeln, zu standardisieren und charakterisieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Aufbau zur Testung der Gefäßwirksamkeit bestimmter Substanzen eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der Versuche sind reproduzierbar. Das Modell bietet somit eine praxisnahe Alternative zum Tierversuch, wobei deutliche Vorteile gegenüber der Zellkulturtechnik oder den isoliert perfundierten Gefäßen bestehen. Buckley et al. (1997) zeigten, dass ein einzelnes Gefäß in seinem Verlauf unterschiedliche Rezeptortypen aufweisen kann und somit auf ein und dieselbe vasoaktive Substanz in unterschiedlichen Bereichen vasokonstriktorisch oder vasodilatativ oder gar nicht reagieren kann. Bei der Erforschung der Pathogenese multifaktorieller Erkrankungen wie der Klauenrehe ist zu erwarten, dass durch die Reaktion nur eines Gefäßes keine Aussage über das initiale Ereignis der Rehe getroffen werden kann bzw. die Auswirkungen auf die von dem Gefäß versorgten Gewebe ermittelt werden kann. Dadurch würde letztlich aber erst der Beweis erbracht, dass es sich um den die Klauenrehe auslösenden Pathomechanismus handelt. Mit dem Modell der isoliert perfundierten Rindergliedmaße wird sowohl das Zusammenspiel der verschiedenen Rezeptorverteilungen im Gefäß genutzt, als auch die Reaktion der umliegenden Gewebe erzeugt. Zudem kann die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Regionen und verschiedenen Gewebe auf Gefäßveränderungen beobachtet werden. Da der tierische Gesamtorganismus jedoch nicht zur Verfügung steht, können systemische Einflüsse, die Ergebnisse verfälschen, ausgeschlossen werden. Zusätzliche Einflüsse auf das Tiermodell wie Stress, Krankheit, Pflege oder Haltungsbedingungen sind bei der isolierten Gliedmaße bedeutungslos, so dass eine geringere Zahl an Versuchen ausreicht. Ökonomisch betrachtet spart das Modell der isolierte perfundierten Rindergliedmaße also nicht nur die Futter-, Pfleger- und Haltungskosten. Bei der Verwendung von Versuchstieren ist eine Verwertung des Tieres zur Fleischgewinnung ausgeschlossen. Die Rindergliedmaße wird vom Schlachttier gewonnen, das regulär in der Schlachtkette bleibt. Die Gliedmaße der Rinder gilt als untauglich und wäre ohnehin nicht verwertet worden. Es sind keine besonderen Schlachtbedingungen notwendig, wodurch es auch anderen Organmodellen gegenüber einen Vorteil besitzt.

Ein Nachteil des Modells ist sicherlich die relativ geringe Versuchsdauer. Die Vitalität kann für eine Versuchsdauer von fünf Stunden gewährleistet werden. Daher ist der Einsatz auf Mechanismen der Initialphase beschränkt. Gerade diese sind aber von zentraler Bedeutung. In diesem Zeitraum wird die noch fehlende Verbindung zwischen metabolischer Störung einerseits und einer lokalen Gewebeschädigung andererseits vermutet (MÜLLING und BERGSTEN, 2004). Fragestellungen, die eine längere Versuchsdauer erfordern sind nicht möglich. So kann beispielweise keine Aussage über den Einfluss einer Substanz auf die epidermale Differenzierung und Verhornung der Klaue getroffen werden, da schon die DNS-Synthesezeit ca. acht Stunden, die gesamte Zellteilung ca. 150 Stunden beträgt (DÖRMER et al., 1964).

Andere Fragestellungen beziehen eventuell die systemische Interaktion mit ein. Viele Effekte sind erst durch Liberation extradermaler Mediatoren, zum Beispiel aus der Leber, oder Bewegung bzw. Belastung der Gliedmaße zu erzielen. In diesem Fall müsste geklärt werden, ob diese Interaktionen in der Perfusionsapparatur nachgestellt werden können oder ob das Modell in diesem Falle ungeeignet wäre.

Mögliche weitere Anwendungsgebiete für das Modell der isoliert perfundierten Rindergliedmaße sind Untersuchungen zum vaskulären System der Klaue, des Klauenbeinhalteapparates sowie deren Auswirkungen auf das Organ Klaue innerhalb von fünf Stunden. Bei Zugabe von Substanzen muss die Adaptationsphase abgewartet werden, wodurch sich die Reaktionszeit des Organs auf 4 Stunden verringert.

Anwendung in anderen Bereichen zum Beispiel zum Resorptionsverhalten der Rinderhaut wären denkbar. Ein Bereich der Forschung, der immer wieder eine hohe Anzahl Versuchstiere benötigt ist die Toxikologie. Die Tierversuche sind hier international weitgehend genormt. Nur in Ausnahmefällen wird auf das Tiermodell verzichtet. Doch in der lokalen Toxizitätsprüfung, wo der Fremdstoffmetabolismus nicht entscheidend ist, werden *in vitro* Modelle immer mehr routinemäßig verwendet. Meist wird der Tierversuch dadurch nicht gänzlich ersetzt, sondern die Zahl der Versuchstiere durch *in vitro* Vorversuche reduziert. Beispielsweise wird eine Einordnung des Stoffes in stark oder schwach toxisch vorgenommen oder toxisch/ nicht toxisch. Zeigt der *in vitro* Versuch schon eine Toxizität an, kann auf den Tierversuch für diese Fragestellung verzichtet werden. Zeigt sich jedoch keine Toxizität, so wird zur Sicherheit der Tierversuch ergänzt. In diesem Bereich der Toxizitätsprüfung ist ebenfalls ein Einsatz der isoliert perfundierten Rindergliedmaße denkbar.

Das entwickelte Modell ist auch weiterhin für verschiedene spezifische veterinärmedizinische Fragestellungen insbesondere zur weiteren Erforschung der Huf- und Klauenrehe interessant, potentiell aber auch für die Humanmedizin attraktiv. Vielfältige pharmakologische und toxikologische Einsatzgebiete sind denkbar. Durch eine Kombination mit modernen Analysen (z.B. PCR) von Gewebeproben aus den perfundierten Gliedmaßen lassen sich die Reaktionen der Zellen auf die eingesetzten Faktoren auf molekularer Ebene erfassen. Die Kombination des hier vorgestellten neuen *ex vivo* Modells mit molekularbiologischen Methoden insbesondere der *real-time* PCR zur quantitativen Analyse von Effekten auf das Expressionsprofil der Zellen wird für künftige Untersuchungen der Pathogenese bei Pferd und Rind empfohlen.