

4. Tiere, Material und Methoden

4.1. Spendertiere

Als Spendertiere werden zwischen 35 und 55 kg (42 ± 5 kg; MW \pm SD) schwere weibliche Schweine der DL*PI (n=22) verwendet, die aus konventioneller Nutztierhaltung stammen und zur Schlachtung bestimmt sind. Die Tiere werden von der Firma Sommerfeld bezogen und bis zur Durchführung der Versuche tierartgerecht gehalten, und zwar in den dafür bestimmten Räumen der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, zertifiziert nach ISO 9001:2000. Im Zusammenhang mit weiteren Organentnahmen werden die Tiere getötet (amtliche Anzeigennummer: O 0094/99).

4.1.2. Narkose

Die Prämedikation erfolgt ca. eine Stunde vor Organentnahme durch intramuskuläre Injektion von 4 - 6 mg/kg Azaperon⁴, 10 mg/kg Ketamin⁵ und 0,05 mg/kg Atropin⁶ in einer Mischspritze. Nach Anlegen eines venösen Zuganges an der Ohrvene wird die Anästhesie mit 0,25 - 0,5 mg/kg Etomidat⁷, bei Bedarf vor der Intubation mit Thiopental⁸ (5 - 10 mg/kg) eingeleitet. Zwecks Relaxation werden 4 mg Pancuroniumbromid⁹ intravenös injiziert.

Sodann wird eine Inhalationsnarkose mittels Isofluranverdampfer¹⁰, bestehend aus einem 40% O₂ + 60% N₂O-Gemisch als Trägergas und 1,5 - 1,8% Isofluran als Anästhetikum, begonnen und aufrechterhalten.

Das Tier wird intraoperativ nach Intubation beatmet. Das Atemzugvolumen liegt bei 100 - 150 ml/kg KG und der Beatmungsdruck bei < 20 - 25 cm H₂O. Es wird intraoperativ ein Et-CO₂ von 32 - 36 mmHg angestrebt.

⁴ Stresnil® Fa. Janssen Neuss/Germany

⁵ Ursotamin® Fa. Serumwerk Bernburg AG/Germany

⁶ Atropinisulfat® Fa. B. Braun AG Melsungen/Germany

⁷ Etomidat-Lipurro Fa. B. Braun AG Melsungen/ Germany

⁸ Trapanal® Fa. ALTANA Pharma GmbH Konstanz/Germany

⁹ Pancuronium® Fa. DeltaSelect GmbH Deireich/Germany

¹⁰ Isofluranverdampfer mit Ohmeda Isotec 5, BOC Healthcare, Fa. Siemens AG

4.2. Blut- und Organgewinnung

Zur Blutgewinnung wird ein Verweilkatheter an die V. jugularis externa gelegt, über den das Blut in 500-ml-Blutkonservenbeutel ohne Stabilisatorzusatz fließt. Die erste Blutentnahme erfolgt zu Beginn der Operation. Während der Entnahme des Jejunumsegmentes wird weiteres Blut entnommen, bis infolge Herz-Kreislaufversagens durch Entbluten der Tod des Tieres eintritt.

Für die Darmperfusion werden dem Schwein im Mittel $1200 \text{ ml} \pm 100 \text{ ml}$ Blut entnommen und in den Blutreservoirbehälter umgefüllt.

Vor der Organentnahme werden im Vorbereitungsraum die Bauch- und die Halsregion rasiert, gereinigt und desinfiziert. Anschließend wird die Bauchregion mit einem sterilen OP-Tuch abgedeckt. Zur Organgewinnung wird der Körper des Tieres in Rückenlage gebracht, ein Hautschnitt in der Medianen gesetzt und in gleicher Länge die oberflächliche Faszie und das Fett durchtrennt. Die Bauchhöhle wird dann durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet. Nach Vorverlagerung des proximalen Jejunums wird ein ca. 150 cm langes Segment ausgewählt, abgemessen und die zugehörigen Gefäße, A. jejunalis und V. jejunalis, freipräpariert.

Kurz vor bzw. hinter der cranialen und der caudalen Schnittstelle werden Darmklemmen gesetzt und die Gefäße im Gekröse dem zu explantierenden Darmsegment zugeordnet und freipräpariert. Gefäßabzweigungen, die diesem Segment nicht zugehörig sind, werden ligiert und abgetrennt, um größere Blutungen zu vermeiden. Der Verschluss der Gefäße im Gekröse erfolgt mittels Ligatur oder Elektrokauter, je nach Größe der Gefäße.

Das zu perfundierende Darmsegment wird im cranialen und im caudalen Bereich eröffnet. Es wird dort je eine native Histologieprobe entnommen. Danach werden die beiden Enden des Darmsegmentes mit einem ca. 15 cm langen Silikonschlauch kanüliert.

Nach Abklemmung und Durchtrennung der Vene und der Arterie wird das Nativgewicht des Darmsegmentes bestimmt. Anschließend werden beide Gefäße kanüliert. Dabei wird die Ischämiezeit so kurz wie möglich gehalten und das Organpräparat unverzüglich an die Perfusionsapparatur angeschlossen.

4.3. Versuchsaufbau

4.3.1. Perfusionsapparatur

Das Perfusionssystem besteht aus einem Dialysatkreislauf sowie aus einem Kreislauf, der mit dem Perfusionsmedium Blut befüllt wird.

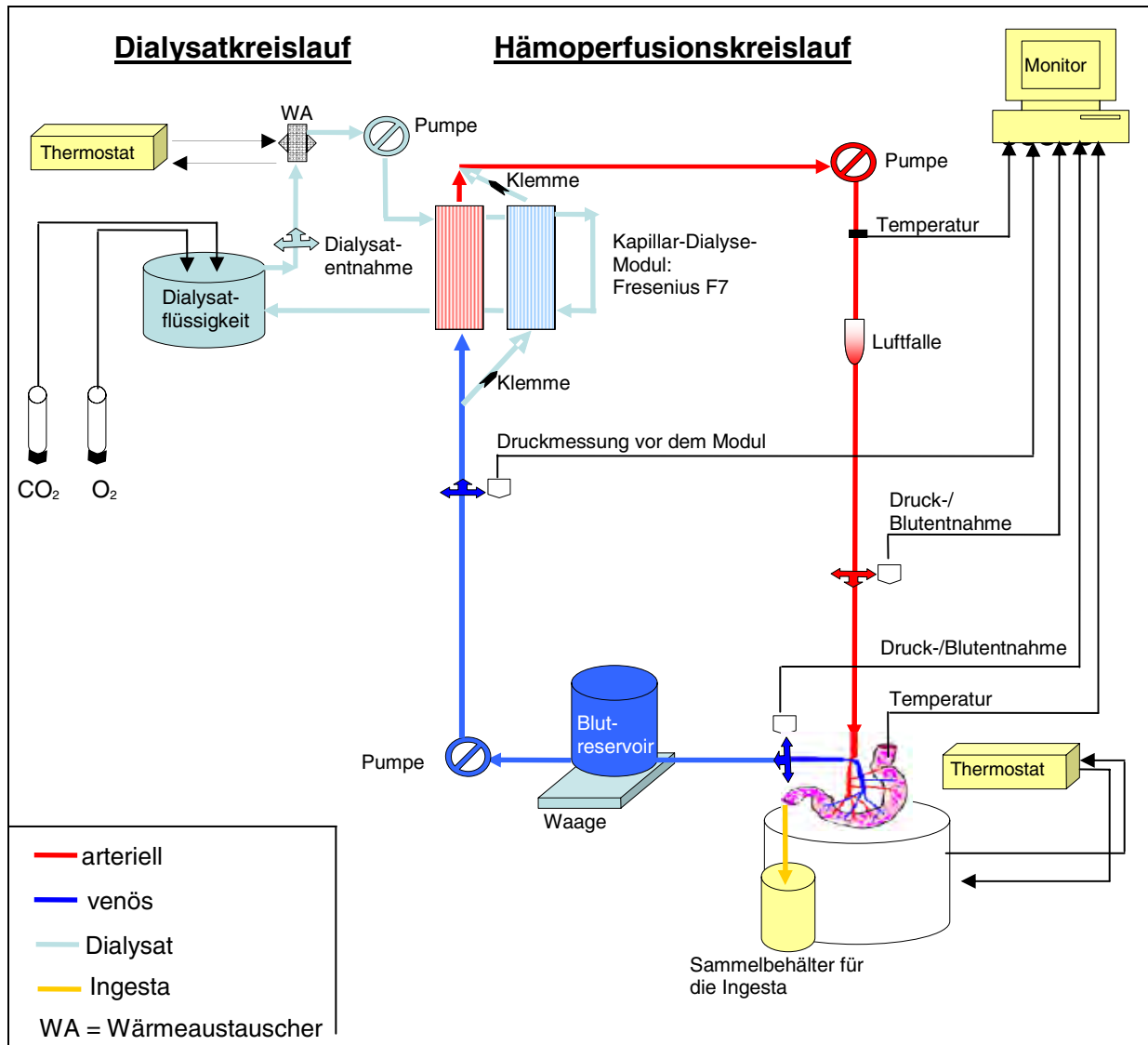


Abb. 1: Schema der Perfusionsapparatur

4.3.1.1. Komponenten des Dialysatkreislaufes

In einen Plexiglaszylinder¹¹ werden 5 Liter der Dialysatflüssigkeit eingefüllt. Dieser Dialysatflüssigkeit wird ein Gasgemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid¹² zugeführt, um über ein Kapillar-Dialyse-Modul¹³, das eine Oberfläche von 1,6 m² und eine Porengröße von 5 000 Dalton besitzt, einen Gasaustausch zu ermöglichen und das venöse Blut mit Sauerstoff anzureichern.

In einer der vier Versuchsgruppen wird eine höhere Heparinkonzentration verwendet als in den drei übrigen. Deshalb wird in die Perfusionsapparatur für die drei Gruppen mit den niedrigeren Heparinkonzentrationen ein zweites Kapillar-Dialyse-Modul eingebaut. Dieses dient dazu, bei Bedarf ein Umschalten zu ermöglichen und somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

Über das O₂-CO₂-Manometer¹⁴ kann der pH-Wert des Blutes reguliert werden.

Mittels einer Einzelkopffrollenpumpe¹⁵ wird die Dialysatflüssigkeit über Silikonschläuche in einen Wärmeaustauscher¹⁶ gepumpt und, gesteuert durch einen Thermostaten¹⁷, auf 38 °C erhitzt. Ein vom Wärmeaustauscher wegführender Silikonschlauch leitet die Dialysatflüssigkeit über die Rollenpumpe in das Kapillar-Dialyse-Modul ein.

Über die Kapillaren des Moduls erfolgt im Gegenstromprinzip ein Austausch von Gasen und Nährstoffen zwischen der Dialysatflüssigkeit und dem Blut. Dabei wird dem Blut überwiegend Sauerstoff zugeführt und über die Dialysatflüssigkeit Kohlenstoffdioxid aus dem Blut abtransportiert. Außerdem werden dabei katabole Substanzen aus dem Blut entfernt.

Des Weiteren findet ein Wärmeaustausch zwischen der zuvor erwärmten Dialysatflüssigkeit und dem Blut statt, so dass eine physiologische Bluttemperatur zwischen 37,5 und 38,5 °C erreicht wird.

Nach Durchlaufen des Kapillar-Dialyse-Moduls führt ein weiterer Silikonschlauch die Dialysatflüssigkeit zurück in den Dialysatbehälter, wodurch sich der Kreislauf schließt.

Um in regelmäßigen Abständen Dialysatproben entnehmen und die Zusammensetzung der Flüssigkeit am Blutgasanalysegerät (BGA)¹⁸ untersuchen zu können, wird zwischen dem Dialysatbehälter und dem Wärmeaustauscher ein Dreiwegehahn eingebaut.

Der Dialysatkreislauf ermöglicht es, die physiologische Zusammensetzung des Blutes aufrechtzuerhalten und dadurch das Jejunumsegment mit Sauerstoff und Energie zu versorgen.

¹¹ Plexiglaszylinder mit einer Füllmenge von max. 7 Liter

¹² Medizinische Kohlenensäure Fa. Linde AG

¹³ Kapillar-Dialysator Modul der Fa. Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg Typ: F7 HPS

¹⁴ O₂-CO₂-Manometer der Fa. Kroline, Duisburg Typ: DK 47 R

¹⁵ Einzelkopf-Rollenpumpe von Stöckert Instrumente, München Fabr.-Nr.: 10 F 2272
(22 Volt 50 Hertz 0,6 Ampère)

¹⁶ Wärmeaustauscher: Fa. Sorin Biomedica CSC 14 Cardioplegia Heat Exchanger

¹⁷ Thermostat: Fa. Julubo Labortechnik GmbH Seelbad, jucABO U3 Typ: 03/7 No.: 8241 613
(220 Volt 50-60 Hertz)

¹⁸ OFM3 Hemoximeter/Analysator der ABL 700 Serie und ABL 800 FLEX: Fa. Radiometer GmbH, Copenhagen

4.3.1.2. Komponenten des Hämoperfusionskreislaufes

Das venöse Blut wird aus dem Blutreservoir über eine Duokopffrollenpumpe¹⁹ gegen den Strom der Dialysatflüssigkeit in das Kapillar-Dialyse-Modul gepumpt. Es erfolgen die Einstellung der Bluttemperatur auf 38 °C sowie der Austausch von Gasen und Nährstoffen, so dass am oberen Ende des Kapillar-Dialyse-Moduls über einen weiteren Silikonschlauch arterielles hämofiltriertes Blut über den zweiten Kopf der Rollenpumpe geleitet wird.

Vor Eintritt des arteriellen Blutes in den kanülierten Abzweig der A. jejunalis ist eine Luftfalle²⁰ zwischengeschaltet. Sie dient der Entfernung von Luftblasen aus dem System und soll die Entstehung von Luftembolien und sekundär eine Schädigung des Organs vermeiden.

Nach Eintritt des arteriellen Blutes in das Jejunumsegment tritt das venöse Blut über einen kanülierten Abzweig der V. jejunalis aus. Ein weiterer Silikonschlauch führt dieses Blut zurück in das Blutreservoir, wodurch auch hier ein geschlossener Kreislauf entsteht. Das Gewicht des Blutreservoirs wird dabei über eine Feinwaage²¹ gewogen.

Um in regelmäßigen Abständen arterielle und venöse Blutproben entnehmen zu können, wird vor der Stelle, an der das Blut in das Organ einfließt und hinter der Stelle, an der es ausfließt, je ein Dreiwegehahn zwischengeschaltet. Ein weiterer Dreiwegehahn wird an der Stelle des Kapillar-Dialyse-Moduls eingebaut, an der das venöse Blut einströmt. An diese Dreiwegehähne werden Druckschläuche²² angeschlossen, die über Druckaufnehmer²³ jeweils den arteriellen und den venösen Druck bzw. den Druck vor dem Modul messen und den Verlauf durch Online-Registrierung direkt auf dem Monitor²⁴ anzeigen.

Die Temperatur des Blutes wird über ein Rektalthermometer im arteriellen Blut gemessen. Die Temperatur des Darms wird mit einem Hautthermometer erfasst, das der Serosa direkt aufliegt. Auf dem Monitor erscheinen die Temperaturen, wie diese durch die Thermometer²⁵ erfasst werden.

¹⁹ Duokopf-Rollenpumpe von Fa. Stöckert Instrumente, München Art.-Nr.: 10-25-00, Fabr.-Nr.: 10 H 5065 (220 Volt 50 Hertz 2*0,8 Ampère)

²⁰ arterielle Bluteitung der Fa. Braun AG, Melsungen

²¹ Feinwaage Satorius BP 3100: Fa. Satorius AG, Göttingen

²² Druckschlauch: Fa. Braun AG, Melsungen

²³ Druckaufnehmer: Fa. Hewlett Packard, Modell 66 S

²⁴ Monitor: Fa. Hewlett-Packard, Modell 1094 B

²⁵ Thermometer: Fa. Hewlett-Packard, Modell 66S

4.4. Versuchsgruppen und Versuchsdesign

4.4.1. Heparinisierungskonzept

Die Einteilung der Versuchsgruppen ergibt sich aus den verschiedenen Heparinisierungskonzepten. Es wird eine Antikoagulation mit Heparin²⁶ in 2 versus 3 Stufen durchgeführt:

1. Tier, 2. Blutreservoir und 3. mit (m) versus ohne (o) Priming (P) der Schläuche.

Im Blutreservoir bzw. den Blutbeuteln wird hohe (h) versus niedrige (n) Heparindosis unterschieden.

Beim Priming wird Heparin über einen Dreiwegehahn in einer bestimmten Menge (s.u.) direkt vor dem Kapillar-Dialyse-Modul einer 500 ml NaCl-Lösung im Schlauchsystem zugeführt. Die NaCl-Lösung zirkuliert im Perfusionskreislauf, so dass eine Beschichtung der Schläuche mit Heparin erfolgt.

I. Bei dem zu etablierenden Modell richtet sich die Auswahl der Heparinkonzentration zunächst nach den in Hämoperfusionskreisläufen anderer Organe (Leber, Niere etc.) üblichen Heparinkonzentrationen (Vorversuche). In den Vorversuchen erhalten die Tiere demnach 300 I.E. Heparin/kg, jedem Blutbeutel werden 10.000 I.E. Heparin zugeführt und vor Versuchsbeginn findet ein Priming des Schlauchsystems mit 10.000 I.E. Heparin statt.

II. In den Hauptversuchen (Gruppen 1 bis 4) wird eine Vollheparinisierung der Tiere mit je 100 I.E. Heparin/ kg durchgeführt. Mit Rücksicht auf die aus den Vorversuchen bekannten Blutungskomplikationen, wird die Heparinkonzentration dabei vor allem im Tier reduziert.

III. Während in der Gruppe 1 den Blutbeuteln jeweils 5.000 I.E. Heparin zugeführt wird, erfolgt in den Gruppen 2 bis 4 eine Vollheparinisierung des Blutes, indem der Blutbeutel I 1.275 I.E. und der Blutbeutel II 625 I.E. erhält. In den Gruppen 2 bis 4 werden also, ausgerichtet an *in vitro* Verhältnissen, ca. 200 I.E. Heparin pro 100 ml Blut zugeführt.

IV. In den Gruppen 3 und 4 findet vor Befüllung des Hämoperfusionskreislaufes mit Blut ein Priming des Schlauchsystems mit 5.000 I.E. Heparin statt.

Demgegenüber unterbleibt in der Gruppe 2 das Priming, um herauszufinden, ob die Gesamtkonzentration an Heparin oder ein Priming des Schlauchsystems für die Aufrechterhaltung eines stabilen Modells entscheidend ist.

²⁶ Liquemin® N 25 000: Heparin-Natrium Injektionslösung, Fa. Roche AG, Grenzach-Wyhlen

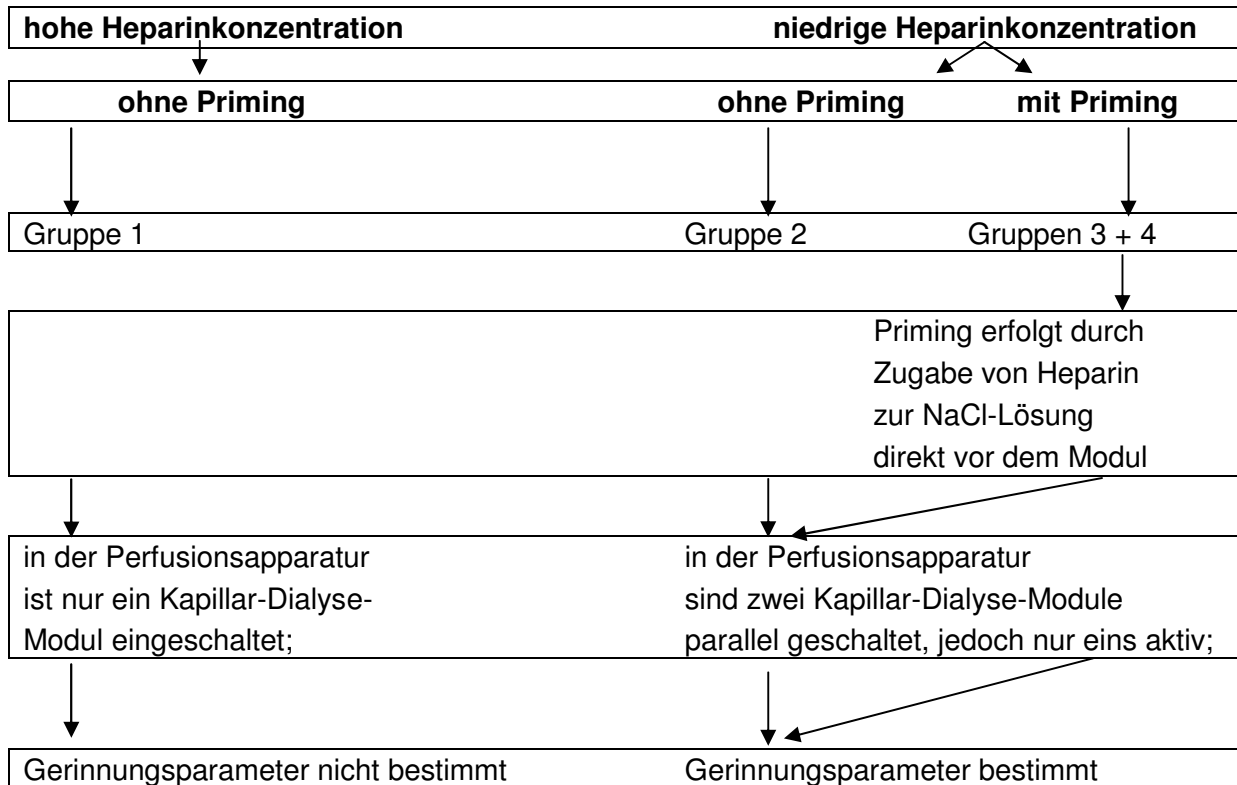
Gruppe	Heparin gesamt [I.E.]	Heparin/kg Tier [I.E.]/kg	Heparin/ Blutbeutel [I.E.]	Heparin/ Priming [I.E.]	Anzahl [n]
1 (hHep oP)	15.750 ± 500	118-135	je 5.000	ohne	4
2 (nHep oP)	6.375 ± 679	90-95	I: 1.275 II: 625	ohne	5
3 (nHep mP)	10.904 ± 413	90-100	I: 1.275 II: 625	5.000	5
4 (nHep mP mCd)	11.300 ± 200	90-100	I: 1.275 II: 625	5.000	4

Tab. 4: Einteilung der Versuchsgruppen

Die Gruppe 4 (nHep mP mCd) wird als funktionelle Kontrollgruppe herangezogen. Es wird das am günstigsten erscheinende Heparinisierungskonzept der Gruppe 3 verwendet; zudem wird über das proximale Lumen 1 mg Cadmiumchlorid (CdCl_2) zugeführt. Mit der Gruppe 4 wird geprüft, ob das Modell, um das es hier geht, prinzipiell zur Untersuchung von Schadstoffen geeignet sein könnte.

Eine detaillierte Auswertung der Cadmiumresorption wird im Rahmen einer anderen Arbeit vorgenommen.

4.4.2. Übersicht des Heparinisierungskonzeptes



4.5. Versuchsablauf

4.5.1. Versuchsvorbereitung

Der Versuch wird vorbereitet durch den Aufbau der Perfusionsapparatur und die Herstellung der zu verwendenden Lösungen. Die benötigten Heparinmengen werden je nach den Erfordernissen der Versuchsgruppen (s.o.) berechnet.

Nach Aufbau der Perfusionsapparatur mit einem Schlauchsystem, das sich aus einer Mehrheit von Schläuchen und ihren Konnektoren zusammensetzt, werden die Schläuche des Hämoperfusionskreislaufes zunächst mit 500 ml isotoner NaCl-Lösung und die des Dialysatkreislaufes mit Dialysat befüllt. Für jeden Versuch werden 5 Liter Dialysatflüssigkeit neu angesetzt, in den Dialysatbehälter umgefüllt und durch Zufuhr von Sauerstoff und Kohlendioxid begast.

Hauptbestandteil der Dialysatflüssigkeit (siehe Tab. 5) ist neben den verschiedenen Elektrolyten Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Calcium (Ca^{2+}) und Chlorid (Cl^-) die Glukose, welche als Energielieferant für die Erythrozyten dient.

Stoff	Molekulargewicht	[mmol/l]	[g/l]
NaCl	58,40	110,0	6,43
KCl	74,60	4,0	0,30
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	1,5	0,22
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	203,31	1,0	0,20
NaHCO_3	84,01	20,0	1,68
NaH_2PO_4	137,99	0,5	0,07
D-Glucose	180,16	5,5	0,99
Harnstoff	60,06	5,0	0,30
Kreatinin	113,20	0,5	0,06

Tab. 5: Zusammensetzung der Dialysatflüssigkeit

Die Pumpflussrate im Hämoperfusionskreislauf beträgt 100 ml/min, während sie im Dialysatkreislauf bei 700 ml/min liegt. Durch die Befüllung der Schläuche mit Flüssigkeit sowie durch Beklopfen des Moduls wird das System von Luftblasen befreit. Über die Aktivierung der Pumpen und der Wärmevorrichtung wird sodann die spätere Perfusionstemperatur von 38 °C eingestellt.

Bei einem Priming mit Heparin wird dieses über einen Dreiwegehahn in einer bestimmten Menge (s.o.) direkt vor dem Kapillar-Dialyse-Modul der NaCl-Lösung und somit dem Schlauchsystem des Kreislaufes zugeführt.

Nach der Abnahme des ersten Blutbeutels wird die NaCl-Lösung aus dem Reservoir soweit abgelassen, dass nur noch die Schläuche mit NaCl befüllt sind.

Damit keine Luft in das System gerät, werden die Schläuche vor dem Reservoir abgeklemmt. Danach werden die Blutbeutel in das Reservoir entleert, die Klemmen von den Schläuchen entfernt und die Pumpen erneut gestartet. Dabei wird so lange Flüssigkeit aus dem Schlauchsystem verworfen, bis das Blut in den Perfusionsschläuchen unverdünnt erscheint. In den Vorversuchen wurde das Blutreservoir nur mit 500 - 600 ml Blut aufgefüllt. Der Anschluß des Darmsegmentes und das Einstellen der baseline waren verzögert.

In den Hauptversuchen (Gruppen 1 bis 4) wird nach der Entnahme des zweiten Blutbeutels der Behälter mit dem Blutreservoir auf 1,2 Liter aufgefüllt, so dass das Organ unmittelbar danach angeschlossen und somit die baseline etwa 10 Minuten früher erreicht werden kann.

Im nächsten Schritt wird eine Aminosäure-Maltose-Lösung zubereitet, die später in zwei Schritten dem Darmsegment zuzuführen ist (Maltose-Lsg.). Diese Lösung enthält neben dem Schleimhautprotektivum Dipeptamin®²⁷ Maltose²⁸, um einen Funktionstest am Darm durchzuführen.

Stoff	Volumen	Endkonzentration
NaCl 0,9%	126 ml	
Dipeptamin®	14 ml	18,83 mg L-Glutamin/ml
		11,48 mg L-Alanin/ml
Maltose	2 g	
Gesamtmenge	142 ml	

Tab. 6: Zusammensetzung der Darmlösung: Aminosäure-Maltose-Lösung der Gruppen 1-4

In der Gruppe 4 (nHep mP mCd) wird außerdem noch 1 mg Cadmiumchlorid (CdCl₂) zugegeben.

²⁷ Dipeptamin® 50 ml, Fa. Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

²⁸ D+Maltose Monohydrate 100 g, Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

4.5.2. Versuchsdurchführung

Für den Organanschluss werden die beiden Pumpen des Hämoperfusionskreislaufes zunächst auf eine Flussrate von 30 ml/min heruntergedreht und dann kurzzeitig abgestellt.

Der bis dahin über zwei Konnektoren und ein ca. 20 cm langes Schlauchstück kurzgeschlossene Kreislauf wird wie folgt erweitert:

Die Schläuche werden vor den Konnektoren abgeklemmt, um einen Lufteintritt zu verhindern. Das 20 cm lange Zwischenstück wird entfernt. Das kanülierte Jejunumsegment wird mit der A. jejunalis hinter der arteriellen Abnahmestelle über einen Konnektor mit dem Schlauchsystem verbunden. Schließlich wird die Schlauchklemme in diesem Bereich entfernt und werden die Pumpen mit der eingestellten Pumpflussrate von 30 ml/min gestartet.

Jetzt wird das Darmsegment wieder mit arteriellem Blut versorgt und die Ischämiezeit somit beendet. Durch langsames Erhöhen der Pumpflussrate auf 100 ml/min fließt das Blut über die V. jejunalis ab.

Nach Entfernen der zweiten Schlauchklemme wird die Vene über einen zweiten Konnektor luftblasenfrei direkt vor der venösen Abnahmestelle angeschlossen.

Das Organ wird auf eine Plexiglasschale gelegt, die mit Wasser gefüllt und mit einer Plastiktüte bespannt ist. Die Schale wird mit 38 °C warmem Wasser durchspült und das Darmsegment zwecks Vermeidung eines Wärmeverlustes mit einer Klarsichtfolie bedeckt. Die Temperatur der Serosa wird kontinuierlich über ein Hautthermometer gemessen und nötigenfalls über einen Thermostaten reguliert.

3 bis 10 Minuten nach Anschluss des Darmsegmentes beginnt die Versuchsaufzeichnung. Dieser Zeitpunkt wird als baseline definiert.

Die Maltose-Lsg. wird dem Darmsegment in zwei Schritten über das proximale Lumen zugeführt. Die Zugabe der ersten 60 ml erfolgt ca. 2 Minuten nach Erfassung der baseline-Werte. Weitere 60 ml werden nach einer Perfusionszeit von 142 Minuten zugeführt.

Bei der Gruppe 4 (nHep mP mCd) wird das am günstigsten erscheinende Heparinisierungskonzept der Gruppe 3 (nHep mP) verwendet und der Aminosäure-Maltose-Lösung noch 1 mg Cadmiumchlorid (CdCl_2) hinzugefügt.

In dieser Gruppe wird, anders als in den übrigen Gruppen (2 * 60 ml), nur einmalig die gesamte Menge von 120 ml der Maltose-Cd-Lsg. in das Darmlumen gegeben, und zwar ebenfalls 2 Minuten nach Erfassung der baseline-Werte.

4.6. Messmethoden, Messparameter und Messzeitpunkte

Vor Versuchsbeginn wird das Gewicht des Tieres ermittelt und protokolliert. Auch werden die Operations- und Laparotomiestarts, die Zeitpunkte und Gesamtkonzentrationen der Heparininjektionen, Beginn und Ende der warmen Ischämie sowie die Ergebnisse kontinuierlicher Messungen der Blutmenge genau festgehalten.

Die Perfusionsdauer beträgt insgesamt 180 Minuten. Während dieses Zeitraums werden in zwanzigminütigen Abständen Proben arteriellen und venösen Blutes und vom Dialysat entnommen. Die Abnahmezeitpunkte werden notiert.

Nach der Perfusion wird die Menge der produzierten Ingesta ermittelt. Die Ingesta wird zentrifugiert. Anschließend wird im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Zentrallabor) der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Leitung Prof. Köttgen, eine Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration vorgenommen. Die Glukose- und Laktatkonzentration wird auch in der Ausgangslösung erfasst, also bevor die Maltose-Lsg. dem Darmlumen zugeführt wird.

4.6.1. Darmlänge und Darmgewichte

Die Länge des Darmsegmentes wird *intra vitam* im Tierkörper mittels eines Maßbandes ermittelt, während die Darmsegmente direkt nach der Entnahme aus dem Tierkörper (nativ) mit sowie nach der Perfusion mit und ohne Mesenterium mittels einer Feinwaage²⁹ gewogen werden.

4.6.2. Temperaturen und hämodynamische Parameter

Mit Hilfe invasiver Messtechnik werden über einen Monitor online die Temperaturen von Blut und Darm aufgezeichnet.

Der systolische und der diastolische arterielle Druck, der arterielle Mitteldruck, der venöse Mitteldruck und der Druck vor dem Modul werden über Druckschläuche³⁰ vom jeweiligen Druckaufnehmer³¹ registriert; die Werte werden ebenfalls auf dem Monitor³² angezeigt. Diese und die an den Einzel³³- bzw. Duokopfpumpen³⁴ direkt ablesbaren Daten des arteriellen

²⁹ Feinwaage Satorius BP 3100: Fa. Satorius AG, Göttingen

³⁰ Druckschlauch: Fa. Braun AG, Melsungen

³¹ Druckaufnehmer: Fa. Hewlett Packard, Modell 66 S

³² Monitor: Fa. Hewlett-Packard, Modell 1094 B

³³ Einzelkopf-Rollenpumpe Fa. Stöckert Instrumente, München Fabr.-Nr.: 10 F 2272
(22 Volt 50 Hertz 0,6 Ampère)

und des venösen Perfusionsflusses sowie des Dialysatflusses werden in Abständen von zwanzig Minuten erhoben und in das Perfusionsprotokoll eingetragen. Auch der O₂-CO₂-Flow wird alle zwanzig Minuten notiert.

4.6.3. Hämatologische Parameter

Aus dem arteriellen EDTA-Blut wird an der baseline und nach 180 Perfusionsminuten ein Differentialblutbild angefertigt und werden folgende Parameter erfasst:

Hämatokrit (Htk), Hämoglobin (Hb), freies Hämoglobin (fHb), Protein und Albumin.

Die hämatologischen Parameter werden im Zentrallabor der Charité³⁵ analysiert.

4.6.4. Klinisch-chemische Parameter und Parameter der Zellschädigung

Die Blutgasanalyse und die Elektrolytbestimmung werden am institutseigenen Blutgasanalysegerät³⁶ durchgeführt. Mit Hilfe dieses Gerätes können die Blutgase, der Säure-Basen-Status und die Elektrolyte Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ sowie Glukose- und Laktatwerte bestimmt werden. Diese Parameter werden im Nativblut sowie in zwanzigminütigem Abstand in den arteriellen und venösen Blutproben sowie den Dialysatproben erfasst.

Die weiteren klinisch-chemischen Parameter und die Parameter der Zellschädigung werden jeweils an der baseline und nach 180 Perfusionsminuten bestimmt, und zwar ebenfalls im Zentrallabor.

Als spezielle Parameter der Zellschädigung werden dabei die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Glutamatdehydrogenase (GLDH) herangezogen. Die LDH stellt ein unspezifisches, in allen Geweben vorkommendes Enzym dar, das freigesetzt wird, wenn Zellen geschädigt werden. Demgegenüber ist die GLDH ein spezifisches Enzym, das bei einer Schädigung der Mitochondrien freigesetzt wird. Die LDH und GLDH werden im Blut und auch in der Ingesta bestimmt.

4.6.5. Funktionsparameter

Zwecks Messungen der Kontraktionen werden jeweils 15 cm des proximalen und des distalen Abschnittes des Jejunumsegmentes durch Nahtfaden begrenzt und in diesen Abschnitten die Anzahl der Kontraktionen pro Minute sowie die Kontraktionsgeschwindigkeit pro 15 cm

³⁴ Duokopf-Rollenpumpe Fa. Stöckert Instrumente, München Art.-Nr.: 10-25-00, Fabr.-Nr.: 10 H 5065 (220 Volt 50 Hertz 2*0,8 Ampère)

³⁵ Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

³⁶ OFM3 Hemoximeter/Analysator der ABL 700 Serie und ABL 800 Flex: Fa. Radiometer GmbH, Copenhagen

registriert. Der proximale Abschnitt des Darmsegmentes stellt den Bereich dar, über den auch die Zugabe der Maltose-Lsg. erfolgt, während im distalen Abschnitt die Ingesta heraustransportiert und in einem Behälter aufgefangen wird. Die Stärke der Kontraktionen wird nach dem Augenschein als leicht, mittel oder stark eingestuft. Alle diese Erhebungen werden jeweils in der 40., der 100. und der 160. Perfusionsminute angestellt.

Der Organwiderstand, der Sauerstoffverbrauch und die venösarterielle Glukose- und Laktatdifferenz werden mit Standardformeln (s. Anhang) berechnet und auf je 100 g Darmgewicht bezogen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgt alle zwanzig Minuten.

4.6.6. Cadmiumbestimmung

Die Bestimmung der Cadmiumkonzentration im Blut und der Ingesta erfolgt mittels der Methode der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bei der SOFIA GmbH³⁷.

Die Atomabsorptionsspektroskopie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Cadmiumkonzentration. Es wird aber auch zum Nachweis von z.B. Blei und anderen Elementen benutzt. Das Verfahren basiert auf der Elektronenanregung durch thermische Energie und der daraus resultierenden Energieänderung, die in Form von elementspezifischen Absorptionslinien im elektromagnetischen Spektrum in Erscheinung tritt.

Der Probe wird zunächst Triton X-100 pro analysis³⁸ als Solvens zugesetzt, sodann HNO₃ Suprapur Matrix Modifier³⁸. Die vorbereitete Probe wird zur Cadmiummessung in den Probenbehälter des Atomabsorptionsspektroskops verbracht. Im Spektroskop 4100 ZL³⁹ wird die Probe in einem Endkappen-Graphitrohr wie folgt erhitzt:

110 °C bzw. 130 °C zum Trocknen der Probe; 500 °C zur Beseitigung organischer Bestandteile = Veraschung; 1.500 °C zur Atomisation, also Anhebung der Elektronen auf eine höhere Atomschale; 2.450 °C als letzte Erhitzung dienen der Reinigung des Graphitrohres.

Während der Atomisation wird das Graphitrohr von einer Hohlkathodenlampe (HKL) durchleuchtet. Die Kathode der HKL ist jeweils mit dem zu untersuchenden Material beschichtet, da die Absorptionslinien einzelner Atome sehr schmal sind. Sobald eine Spannung an die HKL angelegt wird, wandern Elektronen von der Kathode zur Anode. Unterwegs stoßen die Elektronen mit Argonatomen zusammen und ionisieren diese. Diese positiv geladenen Argonionen beschleunigen in Richtung der Kathode und schlagen bei ihrem Aufprall Elementatome heraus. Durch die Kollisionen der freien Elementatome mit den Cadmiumelektronen werden charakteristische Photonen ausgesandt. Die Photonen verlassen die Lampe mit der für

³⁷ Fa. SOFIA GmbH, Berlin

³⁸ Fa. Merck KGaA, Darmstadt

³⁹ Fa. Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut USA

das Element charakteristischen Wellenlänge (gerichtetes Licht), die für Cadmium bei 228,8 nm liegt. Nach Durchtritt durch das Graphitrohr erscheint ungerichtetes Licht mit einer Schwächung, die proportional zur Cadmiumkonzentration in der atomisierten Probe ist. Das ankommende, geschwächte Licht wird mit einem Photomultiplier gemessen. Anhand des Ausmaßes der Lichtschwächung kann die Cadmiumkonzentration in der Probe bestimmt werden. Eine Untergrundkorrektur wird mittels einer Deuteriumlampe durchgeführt. Hierbei wird die Probe zusätzlich mit einer Deuteriumlampe durchleuchtet, die nur die Untergrundlichtemissionen misst. Bei der Auswertung der Probe wird von der Gesamtabsorption der Hohlkathodenlampe (Untergrund und Atomabsorption) die Absorption aus der Deuteriumlampe (Untergrund) abgezogen.

Die Cadmiumkonzentrationen werden auf diese Weise zur baseline, nach 60, 120 und 180 Perfusionsminuten im Blut und nach der Perfusion in der Ingesta ermittelt.

4.6.7. Gerinnungsparameter

Die Hemochron®-aktivierte Gerinnungszeit (Activated Clotting Time = ACT) ist eine Methode, den Gerinnungsstatus innerhalb kurzer Zeit festzustellen. Die Gerinnungszeit des Blutes wird in einem mit Kieselerde durchsetzten Röhrchen ermittelt. Diese Methode ist ausschließlich zur Anwendung auf Heparin als Antikoagulans geeignet. In Kombination mit der Bestimmung der Thrombozytenzahl kann somit eine Aussage über die Funktion des endogenen Gerinnungssystems gemacht werden.

Es wird wie folgt verfahren:

Ein mit Kieselerde durchsetztes Röhrchen wird auf 37 °C erwärmt und unmittelbar nach der Blutentnahme mit 2 ml Blut gefüllt. Zugleich wird die Stoppuhr am Gerät gestartet. Das Röhrchen wird verschlossen und dann vorsichtig geschwenkt, um den Kontaktaktivator (Kieselerde) zu lösen. Anschließend wird das Röhrchen in das Hemochron-Gerät® gesteckt und im Uhrzeigersinn gedreht, bis das Detektorlicht aufleuchtet. Das Erklingen eines Tons zeigt das Ende der Messung an. Die Gerinnungszeit kann am Gerät abgelesen werden. Bei unvollständiger Gerinnung einer Blutprobe wird die Prozedur drei- bis viermal wiederholt und anschließend der Mittelwert als Ergebnis festgestellt.

In den Gruppen 2 (nHep oP), 3 (nHep mP) und 4 (nHep mP mCd) wird die ACT im zwanzigminütigen Abstand ermittelt.

Im Zentrallabor⁴⁰ der Charité werden in diesen Gruppen zur baseline, nach 60, 120 und 180 Perfusionsminuten zusätzlich die Thromboplastinzeit, die partielle Thromboplastinzeit, die Antithrombin-III-Aktivität, das Fibrinogen sowie die D-Dimere bestimmt.

⁴⁰ Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

4.6.8. Histologie

Zur weiteren Bewertung der Perfusion werden histologische Proben entnommen.

Als Referenzproben dienen die Nativproben eines proximalen und eines distalen Jejunumsegmentes, die bereits intraoperativ entnommen werden. Nach Ende der Perfusion (180. Minute), unmittelbar im Anschluss an das Abwiegen des Dünndarmsegmentes, werden drei weitere ca. 5 cm lange Gewebestücke jeweils aus dem proximalen, dem mittleren und dem distalen Abschnitt entnommen. Diese Proben werden in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Ein Teil der Proben wird im Pathologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin aufgearbeitet, der übrige Teil bei der Firma Atugen AG⁴¹ in Berlin-Buch.

Nach Einbettung des formalinfixierten Gewebes in Paraffin mit Hilfe eines Gewebeeinfiltrationsautomaten⁴² werden ca. 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die standardmäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) und teilweise mit Anillin-Blau (Azan-Färbung) gefärbt werden.

Für die HE-Übersichtsfärbung wird der Leica Autostainer XL-Färbeautomat⁴³ verwendet. Als dann werden die Schnitte mittels Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe (100%-96%-70%) entparaffiniert, anschließend in Aqua dest. gewaschen. Danach findet zuerst eine achtminütige Kernfärbung in Hämatoxylin sauer nach Meyer und darauf eine vierminütige Wäsche mit Wasser statt. Es folgen eine ca. halbminütige Gegenfärbung des Zytoplasmas mit Eosin, ein einminütiges Durchspülen mit Wasser und die Differenzierung in 70% Ethanol. Schließlich werden nach zweimaligen je einminütigem Waschen in 96% Ethanol, einmaligen einminütigen Waschen in 100% Ethanol und dreiminütigem Waschen in Xylol die Schnitte luftblasenfrei mit einem Deckglas versehen und histologisch ausgewertet.

Für die Beurteilung der Schnitte wird ein Durchlichtmikroskop⁴⁴ verwendet.

⁴¹ Fa. Atugen AG, Berlin-Buch

⁴² LEICA TP1020 Gewebeeinfiltrationsautomat: Fa. Leica Microsystems GmbH, Nussloch

⁴³ LEICA AUTOSTAINER XL Färbeautomat: Fa. Leica Instruments GmbH, Nussloch

⁴⁴ Durchlichtmikroskop Axioplan 1 der Fa Zeiss: Carl Zeiss GmbH, Jena

4.7. Statistische Methoden

Augrund der Anzahl der Versuchsgruppen, des daraus resultierenden Probenumfangs sowie der aufgetretenen Streubreiten wurde die Berechnung des Median mit Interquartilabstand (IQR) gewählt.

Für die grafische Darstellung der Statistik wurden „Box-and-Whisker-Plots“ sowie Liniendiagramme gewählt.

Das Boxplot-Diagramm besteht aus einer Box, die vom 1. und 3. Quartil begrenzt wird. Die innere Linie repräsentiert den Median. Extremwerte, die um mehr als 3 Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem * markiert. Werte, die um mehr als 1 ½ und bis 3 Kastenlängen außerhalb liegen, werden als Ausreißer bezeichnet und mit einem Kreis ° gekennzeichnet.

Zur Ermittlung der Signifikanz zweier unabhängiger Stichproben wurde als nichtparametrischer Test der Mann-Whitney-U Test verwendet. Um einen signifikanten Anstieg innerhalb einer Gruppe - zwei verbundene Stichproben - zu ermitteln, wurde als nichtparametrischer Test der Wilcoxon Test durchgeführt.

Dabei wird angenommen, dass keine Normalverteilung vorliegt.

Statistische Signifikanz liegt vor bei * $p < 0,05$ und Hochsignifikanz bei ** $p < 0,01$.

4.8. Computer, Hard- und Software

Zur Niederschrift dieser Arbeit diente ein Notebook mit dem Betriebssystem Windows XP Home Edition. Für die Eingabe der Daten und deren statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel XP (Version 2002) und SPSS 11.5 für Windows der Fa. SPSS Inc. eingesetzt. Die Textverarbeitung wurde mit dem Programm Microsoft Word XP (Version 2002) bewerkstelligt, die Herstellung der Grafiken und die Einfügung der Photos mit den Programmen Microsoft Power Point XP (Version 2002) sowie Adobe Photoshop 5.0.