

6. Diskussion

6.1. Qualitätsmerkmale der Perfusion

6.1.1. Funktion

In vitro Perfusionssysteme sind etabliert und werden trotz ihrer Limitierungen zur Untersuchung von Ischämie- und Reperfusionsschäden verschiedener Organsysteme und in der Hämo- und Biokompatibilitätsforschung, aber auch für pharmakologische und toxikologische Fragestellungen eingesetzt (Modersohn, Eddicks et al. 2001; Saito, Westaby et al. 2001; Grosse-Siestrup, Wiemer et al. 2002).

Um Verhältnisse zu schaffen, die denen *in vivo* möglichst nahe kommen, müssen die bekannten Perfusionsmodelle optimiert werden. An solche Modelle werden in Abhängigkeit von Organsystemen und vom Ziel der Untersuchungen unterschiedliche Anforderungen gestellt.

Für Resorptionsstudien an isolierten Darmsegmenten kamen verschiedenste Perfusionslösungen zum Einsatz. Neben reinen Elektrolyt- und Pufferlösungen (Hohenleitner and Senior 1969; Minor, Klauke et al. 1997) wurden Perfusionslösungen auch mit gewaschenen Erythrozyten (Kavin, Levin et al. 1967; Cuber, Bernard et al. 1990) oder künstlichen Sauerstoffträgern (Hartmann, Vieillard-Baron et al. 1984) angereichert. Nur in wenigen isolierten Darmperfuisionsmodellen wurde Vollblut als Perfusionsmedium eingesetzt (Ochsenfahrt 1979; Vatisas, Nieto et al. 2003).

Perfusionsmodelle unter Verwendung reiner Elektrolytlösungen zeigten eine um 50 % schlechtere Sauerstoffaufnahme als solche Perfusionsmodelle, in denen das Perfusionsmedium Hämoglobin enthielt. Erst durch die Zugabe von Steroiden zur Reduktion der Darmmotilität konnte bei der Verwendung von Elektrolytlösungen eine bessere Sauerstoffversorgung der Präparate erreicht werden. Dabei wurde jedoch keine histologische Bewertung der Präparate durchgeführt (Hohenleitner and Senior 1969).

Ziel dieser Arbeit ist es und die dafür angestellten Versuche waren darauf ausgerichtet, ein Perfusionsmodell unter möglichst *in vivo* nahen Verhältnissen zu etablieren. Deshalb wurde Vollblut als Perfusionsmedium eingesetzt und die Ischämiezeit so kurz wie möglich gehalten. Die Etablierung eines Hämoperfuisionsmodells für den Darm ist aufgrund der Antikoagulation und der Sensibilität der Geräte (z.B. Kapillar-Dialyse-Modul, Druckmesser etc.) mit einem hohen methodischen Aufwand verbunden. Bereits die ersten Anwender einer isolierten Darmperfusion sahen die Notwendigkeit, die Qualität der Perfusion fortlaufend zu überprüfen

und zu sichern, weil nur unter optimalen Bedingungen ein vitales Präparat zu gewährleisten ist (Hohenleitner and Senior 1969).

Zur Kontrolle der Qualität und Stabilität der Perfusion wurden zunächst der **arterielle Blutfluss** sowie der **arterielle Perfusionsdruck** für geeignet gehalten (Kavin, Levin et al. 1967; Windmueller, Spaeth et al. 1970).

Unser Bestreben lag darin, über einen konstanten Blutfluss von 100 ml/min einen konstanten Verlauf des arteriellen Mitteldruckes zu erhalten.

Bei uns liegt zu Beginn der Perfusion der **arterielle Mitteldruck** zwischen 62 mmHg (Gruppe 3: nHep mP) und 124 mmHg (Gruppe 2: nHep oP). In den Gruppen 1 (hHep oP), 3 (nHep mP) und 4 (nHep mP mCd) fällt der arterielle Mitteldruck in den ersten Perfusionsminuten zum Teil deutlich ab (s. Anhang Abb. 41) und verläuft danach weitgehend konstant.

Es ist anzunehmen, dass eine anfängliche, durch die Ischämie bedingte Vasokonstriktion für den initialen Druckanstieg verantwortlich ist und anschließend eine Relaxation einsetzt (Kavin, Levin et al. 1967).

In der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 liegen über den gesamten Perfusionszeitraum signifikant höhere Medianwerte (* $p < 0,05$) gegenüber der niedrig heparinisierten Gruppe 3 mit Schlauchsystempriming vor. In der Gruppe 2 treten zudem deutliche Schwankungen beim arteriellen Mitteldruck auf. Auch Flussregulation machte es nicht möglich, in dieser Gruppe einen konstanten Druckverlauf zu erzielen.

Die Schwankungen in dieser Gruppe sind unter anderem darauf zurückzuführen, dass bei 2 von 5 Darmsegmenten die Notwendigkeit bestand, auf parallel geschaltete Module umzuleiten. Dadurch wurde bei diesen Darmsegmenten (#16 und #17) kurzzeitig eine Hämodilution herbeigeführt, so dass vor allem der arterielle Mitteldruck zwischen der 60. und 120. Perfusionsminute sank und anschließend wieder anstieg.

Ein ähnliches Ergebnis ist auch bei der **Druckmessung vor dem Kapillar-Dialyse-Modul** zu finden. Sie sollte einen Aufschluß über die Funktionsfähigkeit und Durchlässigkeit der Kapillarmembranen geben.

In der ersten Perfusionsstunde fallen die Mediane in den Gruppen 1 (hHep oP), 2 (nHep oP) und 4 (nHep mP mCd) ab und verlaufen anschließend nahezu konstant.

Die Gruppe 3 (nHep mP) weist einen fast durchgehend konstanten Verlauf bei kleiner interquartiler Range auf und scheint damit am geringsten auf den Organanschluss zu reagieren.

In der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 konnte auch vor dem Modul keine Konstanz des Drucks erreicht werden. Die Werte liegen zwischen 41 und 73 mmHG und somit deutlich höher als in der Gruppe 3, die Werte zwischen 27 und 30 mmHg aufweist.

Weitere wichtige Parameter für die Qualitätskontrolle sind der **Perfusionswiderstand** und der **Sauerstoffverbrauch**. Der Sauerstoffverbrauch gibt Aufschluß über die Aktivität des Zellstoffwechsels. Eine unzureichende Sauerstoffversorgung erweist sich häufig als Hauptproblem bei der extrakorporalen Perfusion isolierter Darmsegmente (Hartmann, Vieillard-Baron et al. 1984).

In der ersten Perfusionsstunde ist ein leichter (Gruppe 3) bis deutlicher (Gruppen 1, 2 und 4) Abfall des Perfusionswiderstandes zu verzeichnen. Der Sauerstoffverbrauch steigt in den niedrig heparinisierten Gruppen 3 und 4, bei denen ein Priming des Schlauchsystems durchgeführt wurde, innerhalb der ersten Perfusionsstunde deutlich und in den Gruppen 1 und 2 nur leicht an.

Es ist anzunehmen, dass es, wie auch bei der Nierenperfusion, nach dem Aufheben der warmen Ischämie zu einer Reaktion der Gefäße in Form einer Vasodilatation und damit zu einem abnehmenden Perfusionswiderstand kommt (Brook, Knight et al. 2003).

Der zunehmende Sauerstoffverbrauch innerhalb der ersten Stunde hängt möglicherweise ebenfalls mit der einsetzenden Relaxation der Gefäße nach der Reperfusion zusammen.

Die am niedrigsten heparinisierte Gruppe 2 weist über den gesamten Perfusionszeitraum mit Werten zwischen 0,47 und 0,75 mmHg*min/ml*100 g signifikant höhere Perfusionswiderstände als in den übrigen Gruppen auf. Zugleich findet in dieser Gruppe ab der 60. Perfusionsminute mit Werten zwischen 71,8 und 50,6 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ ein konstant niedrigerer Sauerstoffverbrauch statt (* $p < 0,05$) als in den niedrig heparinisierten Gruppen mit Priming. Bei den niedrig heparinisierten Gruppen (3 und 4) mit Schlauchsystempriming werden Medianwerte bis zu 152,8 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ erreicht.

DUBIN et al. untersuchten an Schafen den Kohlendioxidpartialdruck der Harnblase während der Induktion eines hämorrhagischen Schocks und nach der Reperfusion. Im Rahmen dieser *in vivo* Untersuchungen verglichen sie auch den intestinalen Sauerstoffverbrauch während der Ischämie und nach der Reperfusion miteinander. Die Basalwerte lagen bei 119,3 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$. Nach Eintritt des Schocks erhielten sie in der warmen Ischämiephase Werte um 75,9 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ und in der Reperusionsphase Werte um 124,0 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ (Dubin, Pozo et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden in den Gruppen 3 und 4 über den Perfusionsverlauf erreicht.

DESAI et al. führten eine isolierte Hämoperfusion mit humanen Jejunumsegmenten durch und zeigten, dass erst ab einem arteriellen Blutfluss von unter 30 ml/min*100 g der Sauerstoffverbrauch abhängig vom Blutfluss zu sein scheint (Desai, Sisley et al. 1996). In dieser

Studie wurde ab einem Perfusionsfluss von 30 ml/min*100g ein Sauerstoffverbrauch von 68,9 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ erreicht.

Die Regulation des intestinalen Blutflusses ist dabei metabolischen und myogenen Mechanismen zuzuschreiben (Shepherd 1982).

Die aufgetretenen Schwankungen in der Gruppe 2 ohne Schlauchsystempriming sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass es infolge unzureichender Sauerstoffversorgung zu wechselnden Reaktionen der Gefäße in Form von Vasokonstriktion und Vasodilatation kommt. Wahrscheinlich ist auch der schlechte Sauerstoffverbrauch darauf zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass es mangels Primings des Schlauchsystems zu einem Verschluss der Kapillarmembranen im Dialyse-Modul gekommen ist. Daraus resultiert eine unzureichende Oxygenierung des Blutes.

Beim Umschalten auf weitere Kapillar-Dialyse-Module (Darm #16 in der 40. Perfusionsminute und Darm #17 in der 40. und 80. Perfusionsminute) führte möglicherweise die geringe Hämodilution und die dadurch bewirkte Abnahme der Viskosität des Blutes zu einem geringeren Perfusionswiderstand (Murray and Escobar 1968).

In der Gruppe 1 mit hoher Heparinkonzentration lag der Sauerstoffverbrauch mit Werten von 70,1 bis 82,8 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ bei gleichzeitig niedrigen Perfusionswiderständen ebenfalls im unteren Bereich. Dies legt die Vermutung nahe, dass zu hohe Heparinkonzentrationen auch den Sauerstoffverbrauch beeinflussen.

MALIUK et al. isolierten Mitochondrien aus Kaninchenherzen und stellten fest, dass hohe Heparinkonzentrationen die oxidative Phosphorylierung beeinflussen und zu einer Entkopplung der Atmungskette führen. Ursache dafür scheint eine Veränderung der Ultrastruktur der Mitochondrien zu sein (Maliuk Vol I, Maliuk VI et al. 1976).

Heparin scheint somit zwar die rheologischen Eigenschaften des Blutes zu verbessern, aber in zu hohen Konzentrationen auch zur Verminderung des Sauerstoffverbrauchs zu führen.

Als weitere Qualitätsmerkmale sind unter den hämatologischen Parametern insbesondere der **Hämoglobingehalt** und die **Erythrozytenkonzentration** heranzuziehen.

Tendenziell kommt es in allen Gruppen zu einer leichten Hämokonzentration mit steigenden Hämoglobin- und Erythrozytenwerten im Blut.

Der baseline-Wert der Erythrozytenkonzentration ist in der Gruppe 4 (nHep mP mCd) signifikant höher als in der Gruppe 3 (nHep mP), da schon unterschiedliche Ausgangswerte bei den Spendertieren vorlagen.

Während die Gruppe 4 auch hinsichtlich des Hämoglobingehaltes einen vergleichsweise deutlich höheren basline-Wert hat, kommt es in der Gruppe 2 (nHep oP) innerhalb der ersten Perfusionsstunde zu einem signifikanten Anstieg der Hämoglobinkonzentration. Die Hämokonzentration scheint insgesamt in den Gruppen 2 und 4 am stärksten ausgeprägt zu sein. Sie ist teilweise methodisch bedingt, da es über das Kapillar-Dialyse-Modul zu Flüssigkeitsverschiebungen in das Dialysat kommen kann.

Die leichten Schwankungen der Hämoglobinkonzentration innerhalb der jeweiligen Gruppe sind darauf zurückzuführen, dass eine Gegenregulierung über die Rollenpumpenantriebe des Dialysat- und Blutkreislaufes erfolgte, um die Dialysatmenge konstant zu halten.

Die Bestimmung der **Laktatdehydrogenase (LDH)** sowie der **Glutamatdehydrogenase (GLDH)** im Blut und in der produzierten Ingesta ist sehr wichtig für die Qualitätsbeurteilung. Die Freisetzung intrazellulärer Enzyme in das extrazelluläre Medium gibt einen Hinweis darauf, ob eine Zellschädigung stattgefunden hat oder nicht (Mack, Marsh et al. 1993).

Tendenziell steigt die LDH im Blut in allen Gruppen an und dieser Anstieg indiziert eine unspezifische Zellschädigung.

Die GLDH ist ein mitochondriales Enzym, dessen Aktivität bei Schädigung der Mitochondrien im Blutplasma steigt (Filez, Stalmans et al. 1990).

Die Konzentration der GLDH im Blut nimmt in der Gruppe 3 (nHep mP) kaum zu. Nach 180 Perfusionsminuten weist die Gruppe 2 (nHep oP) mit 1,23 U/l *100 g im Vergleich mit der Gruppe 3 (nHep mP) mit 0,58 U/l *100 g einen signifikant höheren Wert auf. Die am niedrigsten heparinisierte Gruppe 2 erfährt den größten Anstieg der GLDH-Konzentration und somit einen höheren Grad der Mitochondrienschädigung.

Der hohe baseline-Wert (Median) in der Gruppe 2 ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es zu Perfusionsbeginn wegen sehr niedrig eingesetzter Heparinkonzentrationen und mangels Primings des Schlauchsystems, zu einer frühen mitochondrialen Schädigung gekommen ist.

Dass es sich dabei vor allem auch um geschädigte Erythrozyten handelt, zeigt sich an dem Anstieg der Konzentration des **freien Hämoglobins**. Mit zunehmender Zerstörung der Erythrozyten steigt somit nicht nur die Konzentration an freiem Hämoglobin, sondern auch die Konzentration von LDH und GLDH im Blutplasma.

Die Gruppen 2 und 4 weisen im Hinblick auf die Zunahme der Konzentration an LDH/GLDH und freiem Hämoglobin am Ende der Perfusion die höchsten Anstiege der Mediane bei großer IQR auf, so dass die Hämolyse in diesen Gruppen stärker ausgeprägt ist. Da in diesen Gruppen auch die Drücke vor den Kapillar-Dialyse-Modulen hoch waren und somit anzunehmen ist, dass sich die Kapillaren zugesetzt haben, könnte das die Blutschädigung

zwanglos erklären. Dabei ist trotz Priming des Schlauchsystems in der Gruppe 4 die Hämolyse stärker ausgeprägt als in der Gruppe 3.

Das Blut der Spendertiere scheint in Gruppe 4 insgesamt von höherer Viskosität und somit anfälliger für eine Interaktion mit den Kapillarmembranen zu sein. Einen Hinweis auf die Viskosität geben neben den Erythrozyten- und Hämoglobinwerten auch die hohen baselinewerte der Protein- und Albuminkonzentration in dieser Gruppe.

Der **Gehalt an LDH und GLDH in der Ingesta** ist ein Zeichen für den Grad der Zellschädigung in der Mukosa. Nach einer Autotransplantation von Katzendärmen konnte durch kalte Konservierung die Zellschädigung in den Mikrovilli des Darms reduziert sowie die Integrität der Mitochondrienmembran während der Reperfusion besser aufrecht erhalten werden (Filez, Penninckx et al. 1994).

Die hoch heparinisierte Gruppe 1 und die Gruppen 3 und 4 mit Schlauchsystempriming weisen in der Ingesta tendenziell einen etwas niedrigeren Gehalt an LDH und GLDH auf, was darauf hindeutet, dass der Mukosaschaden in diesen Gruppen etwas geringer ausfällt als bei der Gruppe 2. Eine statistische Signifikanz liegt jedoch nicht vor.

Die **funktionellen Parameter** sind wichtig für die Beurteilung der Vitalität der Darmsegmente. In Perfusionsmodellen der isolierten Darmperfusion dient z.B. die Kontraktionsmessung als Funktionsnachweis; ihre Ergebnisse werden zur Beurteilung der Vitalität des Präparates herangezogen (Vatistas, Nieto et al. 2003).

Die **Kontraktionsfrequenzen und Kontraktionsgeschwindigkeiten im proximalen und distalen Abschnitt** der Darmsegmente zeigen keine gravierenden Unterschiede. In den Gruppen 2 und 3 kommt es in der 100. Perfusionsminute lediglich zu einem Abfall der Medianwerte um 2 bis 3 Kontraktionen/min mit nachfolgendem Anstieg bzw. konstantem Verlauf (distal Gruppe 3). Demgegenüber nimmt die Kontraktionsfrequenz in der Gruppe 2 (hHep oP) nur im distalen Abschnitt kontinuierlich um 2 Kontraktionen/min ab.

Insgesamt zeigt sich, dass mit abnehmenden Kontraktionsfrequenzen die Kontraktionen langsamer werden (s. Abb.19 und 20).

Mögliche Veränderungen in der Kontraktion sind auf eine Freisetzung von Neurotransmittern oder auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen. Die Motilität kann entweder direkt durch hypoxische Zustände oder indirekt durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren beeinflusst werden (Malone 1987; Malone and Kannan 2001). Interleukine und Prostaglandine beeinflussen dabei die Motilität und die enterische Muskelfunktion, was sich in Form einer Hemmung der Kontraktilität oder in Form von Exzitationen äußert (Burakoff and Percy 1992; Moreau, More et al. 1993).

Exzitationen konnten nur vereinzelt in Darmsegmenten aus der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 (nHep oP) und in einem Darmsegment in der Gruppe 4 (nHep mP mCd) kurz vor Perfusionsende beobachtet werden.

Auch **Glukoseverbrauch und -resorption** werden in isolierten Darmpräparationen als Vitalitätsparameter herangezogen (Kavin, Levin et al. 1967).

Den Darmsegmenten wurde dafür nach Erfassung der baseline-Werte (Gruppe 1 bis 4) sowie zur 140. Perfusionsminute (Gruppe 1 bis 3) eine Maltose-Lsg. hinzugeführt.

Die Saccharase ist dabei das Enzym, das vor allem die Spaltung des Disaccharids Maltose übernimmt (von Engelhardt and Breves 2000). Nur durch intakte Bürstensaumenzyme ist die Spaltung von Maltose in zwei Moleküle Glukose gewährleistet (Stangl, Krapp et al. 2000). Ein intakter intestinaler Bürstensaum stellt somit ein weiteres Kriterium für die Beurteilung der Vitalität des Dünndarms dar (Eloy, Battinger et al. 1979).

Ansteigende bzw. abfallende Werte der **venösarteriellen (va_) Glukosedifferenz** deuten auf Glukoseresorption bzw. -verbrauch durch den Darm hin. In den Gruppen 1 bis 4 ist nach der Gabe der jeweiligen Maltose-Lsg. ein Anstieg der Mediane der va_Glukosedifferenz zu verzeichnen.

Nur in der niedrig heparinisierten Gruppe 3 mit Priming fällt der Anstieg, mit einem Wert von 0,087 mmol/min*100 g nach Gabe der ersten 60 ml Maltose-Lsg. und 0,057 mmol/min*100 g nach Gabe der zweiten 60 ml Maltose-Lsg. zu beiden Zeitpunkten (20. und 140. Perfusionsminute) statistisch signifikant aus (*p<0,05).

In der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 ohne Priming tritt nur nach Gabe der ersten 60 ml der Maltose-Lsg. ein signifikanter Anstieg der va_Glukosedifferenz auf. In dieser Gruppe wird innerhalb der ersten 20 Minuten insgesamt vergleichsweise wenig Glukose, 0,044 mmol/min*100 g und nur 0,027 mmol/min*100 g zwischen der 140. und 160. Perfusionsminute resorbiert. Das Darmsegment #17 dieser Gruppe zeigt bei der va_Glukosedifferenz einen Extremwert [*12]. Dieser Anstieg stellt ein Artefakt dar und ist nicht auf eine Glukoseresorption zurückzuführen.

Aufgrund unzureichender Oxygenierung des Blutes durch Verschluss der Kapillarmembranen, musste das Blut zur 40. und zur 80. Perfusionsminute auf ein parallel geschaltetes Kapillar-Dialyse-Modul umgeleitet werden. Das Umschalten auf weitere Kapillar-Dialyse-Module hatte zur Folge, dass es zweimal innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes zu Dialysatverschiebungen in das Blut kam. Die daraus resultierende Hämodilution des arteriellen Blutes führte zu positiven Werten der va_Glukosedifferenz, denen aber die Aussagekraft fehlt.

Dass in dieser Gruppe insgesamt weniger Glukose resorbiert wurde, zeigt auch die festgestellte **Gesamtmenge an Glukose in der Ingesta**: Die Gruppe 2 weist mit 1,98 mmol*100 g (Median) einen deutlich höheren Wert auf als die übrigen Gruppen.

OCHSENFART et al. verglichen die Ergebnisse der Glukoseresorption, die aus *in vivo* und *in vitro* Rattenperfusionsmodellen anderer Autoren resultierten, miteinander (Ochsenfahrt 1979):

Modell	Glukoseresorption [mmol/min*100 g]	Autor(en)
<i>in vivo</i>	0,156 ± 0,015	Jervis et al. (1965)
	0,085 ± 0,001	Forth et al. (1966)
	0,135 ± 0,006	Coupar and McColl (1975)
Isolierter Darm ohne Blutfluss	0,492 ± 0,042	Fisher and Parsons (1949)
	0,342 ± 0,022	Fisher and Gardner (1974a)
Isoliert perfundierter Darm	0,03	Forth (1967)
	0,034 ± 0,005	Kavin et al. (1967)
	0,124 ± 0,004	Coupar and McColl (1975)

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der Glukoseresorption in mmol/min*100 g anderer Autoren

Aus der Tabelle 8 geht hervor, dass die Glukoseresorption sowohl *in vivo* also auch in isoliert perfundierten Rattendärmen mit den von uns ermittelten Werten vergleichbar ist. Nur in den isolierten Rattendärmen ohne Blutfluss wurde vergleichsweise mehr Glukose resorbiert.

Bei der Betrachtung der **Gesamtmenge an Glukose im Dialysat** ist daran zu denken, dass der Dialysatflüssigkeit 5,5 mmol/l Glukose zugeführt und somit physiologische Blutglukosewerte des Schweins hergestellt wurden.

Damit wurde bezweckt, einen Konzentrationsausgleich zwischen Dialysat und Blut zu schaffen. Während in der Gruppe 1 (hHep oP) ein größerer Abfall der **Gesamtmenge an Glukose im Dialysat** zu verzeichnen ist - was für einen Glukoseverbrauch spricht -, bleibt sie in den Gruppen 2 (nHep oP) und 3 (nHep mP) relativ konstant und steigt in der Gruppe 4 (nHep mP mCd) etwas an.

Die Gruppe 4 (nHep mP mCd) diene als funktionelle Kontrollgruppe. In dieser Gruppe erfolgte nur eine einmalige Gabe von insgesamt 120 ml einer Maltose-Cd-Lsg.

Die v_a Glukosedifferenz weist in dieser Gruppe einen deutlichen Anstieg des Medians um 0,151 mmol/min*100 g auf, der aufgrund der kleinen Fallzahl (n=4) statistisch nicht signifikant

ist. Die v_a -Glukosedifferenz fällt im weiteren Verlauf kontinuierlich ab (s. Anhang Abb. 47), woraus man schlussfolgern kann, dass der Glukoseverbrauch über den Perfusionszeitraum überwiegt.

Bei Tieren konnte in Geweben des Nierenmarks und in Leukozyten eine aerobe Glykolyse unter **Bildung von Laktat** nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass in der intestinalen Mukosa einiger Tierarten ebenfalls aerob Laktat produziert wird (Wilson 1956). Vor allem bei Ratten und Katzen, die eine hohe aerobe Glykolyserate aufweisen, wurde festgestellt, dass die Umwandlung von Glukose in Laktat eine wichtige Rolle bei der Resorption von Glukose spielt (Wilson 1954).

Untersuchungen mit der *everted sac* Methode an Ratten haben ergeben, dass die Resorption von Glukose aus dem Lumen mit einer teilweisen Umwandlung in Laktat in den Epithelzellen und mit anschließender Freisetzung von Laktat ins Blut einhergeht. Dabei werden 50 bis 80% der Glukose, die auf der Mukosaseite verloren geht, in Laktat umgewandelt, das dann in höherer Konzentration auf der Serosaseite erscheint (Wilson 1956). Die bevorzugte Abwanderung von Laktat in Richtung Serosa gab Anlass zu der Vermutung, dass die Laktatbildung eine wichtige Rolle bei der Glukoseresorption spielt.

Die Glukose- und Laktatergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Glukoseresorption und Laktatproduktion besteht.

Die abfallenden Werte der **venösarteriellen (v_a) Laktatdifferenz** deuten auf eine Laktatproduktion hin.

Die teilweise initial hohen Werte der v_a -Laktatdifferenz sind möglicherweise auf die Ausgangssituation im Spendertier zurückzuführen. Da die warme Ischämiezeit im Mittel bei 10 ± 3 Minuten lag, ist auch eine Laktatbildung aus anaerober Glykolyse während der Ischämiephase nicht auszuschließen.

Die ansteigenden Werte der v_a -Laktatdifferenz zwischen der 140. und der 160. Perfusionsminute geben Anlass zu der Vermutung, dass bei der Spaltung von Maltose in zwei Moleküle Glukose auch Laktat gebildet und nachfolgend resorbiert wurde. Einen Hinweis darauf gibt die Kontrollgruppe 4, bei der zu diesem Zeitpunkt keine weitere Lösung zugeführt wurde und auch kein Anstieg der v_a -Laktatdifferenz zu verzeichnen war.

BELLOMO et al. konnten im Hundemodell eine Laktataufnahme durch den Darm beobachten. Sie untersuchten den Einfluss verschiedener Organe auf die Laktataufnahme und -freisetzung während der frühen Endotoxämie. Hierbei stellten sie fest, dass im Gastrointestinaltrakt bereits vor der Infusion von Endotoxinen eine Laktataufnahme erfolgte (Bellomo, Kellum et al. 1996).

Die Bedeutung der Umwandlung von Glukose in Laktat variiert dabei abhängig von *in vitro* oder *in vivo* Versuchsbedingungen sowie in Abhängigkeit von den verwendeten Tierspezies (Wilson 1954).

Im Perfusionsmodell hat neben der Laktatproduktion auch eine Resorption von Laktat stattgefunden. Vor allem die Ergebnisse der Gruppe 3 (nHep mP) begründen die Wahrscheinlichkeit, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Glukose- und Laktatresorption besteht. In der **Ingesta** weist diese Gruppe die niedrigste **Gesamtmenge an Glukose und Laktat** auf. Auch ist bei einem relativ konstanten Verlauf der Glukosemenge im Dialysat zu beiden Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg der va_{Glukose} im Blut zu verzeichnen. Der hohe baseline-Wert und der kontinuierliche langsame Abfall der va_{Laktat} , ebenso wie der Anstieg der Gesamtmenge an Laktat im Dialysat und der deutlich höhere Sauerstoffverbrauch in dieser Gruppe lassen vermuten, dass das Laktat unter aeroben Bedingungen entstanden ist.

Ein Anstieg der va_{Laktat} nach Gabe der ersten 60 ml Maltose-Lsg. bleibt dabei aus, weil ein Teil des gebildeten Laktats über die Kapillarmembranen des Moduls aus dem Blut in die Dialysatflüssigkeit übertritt. Im Gegensatz zur Glukose wird beim Ansetzen der Dialysatflüssigkeit kein Laktat zugeführt und somit kein Konzentrationsausgleich geschaffen. In der hoch heparinisierten Gruppe scheint der Glukoseverbrauch zu überwiegen, da ein deutlicher Abfall der Glukosemenge im Dialysat zu verzeichnen ist, während sich der Anstieg der Laktatmenge im Dialysat ähnlich wie in den Gruppen 3 und 4 verhält.

Da die Glukoseresorption nach einer Sättigungskinetik verläuft, unterlag die im Lumen befindliche, nicht resorbierte Glukose in der in der Gruppe 2 (nHep oP) und in der Gruppe 4 (nHep mP mCd) zum Perfusionsende möglicherweise der anaeroben Glykolyse, womit die höheren Laktatwerte in der Ingesta zu erklären wären.

Der Anstieg der **Gesamtmenge an Laktat im Dialysat** gegenüber dem baseline-Wert ist in den Gruppen 2 und 3 statistisch signifikant ($*p < 0,05$). Das der Anstieg in den Gruppen 1 und 4 nicht signifikant ausfällt, liegt wiederum an der kleinen Fallzahl ($n=4$) statistisch. Denn insgesamt fällt der Anstieg des Medianwertes in der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 am höchsten und in der Gruppe 3 mit Schlauchsystempriming am niedrigsten aus.

Die ansteigenden Laktatwerte im Dialysat sind auf die semipermeablen Eigenschaften der Kapillarmembranen des Dialyse-Moduls zurückzuführen. Da sich in der Dialysatlösung zu Perfusionsbeginn kaum Laktat befindet, kommt es zu Verschiebungen von Laktat aus dem Blut ins Dialysat. Aus diesem Grund ist in fast allen Gruppen hinsichtlich der va_{Laktat} - im Gegensatz zur Glukose - kaum ein Anstieg wahrnehmbar.

Ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal erbringt die **histologische Beurteilung** der perfundierten Darmsegmente. Es kommt in allen perfundierten Darmsegmenten zur Ausbildung von interstitiellen Ödemen und zur Ausbildung von Lymphangieektasien.

Diese Ödembildung spiegelt sich auch in einer deutlichen relativen Gewichtszunahme während der Perfusion wider. In der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 liegen die Werte der relativen Gewichtszunahme zwischen 35,4 und 113,0 %. Bei den Därfen #16 und #17 ist infolge des Umschaltens auf weitere Kapillar-Dialyse-Module nach der Perfusion eine mehr als 100 %ige Gewichtszunahme zu verzeichnen. In der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 ist die relative Gewichtszunahme dabei signifikant höher (* $p < 0,05$) als in der Gruppe 3.

Die Gruppen 3 und 4, bei denen ein Priming des Schlauchsystems durchgeführt wurde, zeigen auch im Hinblick auf die Histologie bessere Ergebnisse. Die Zotten und der Mikrovillisaum erscheinen intakt, während in der Gruppe 3 gestaute GefäÙe mit Endothelschädigung sowie abgeschilferte Epithelzellen das Bild prägen.

Die hingegen in der Gruppe 1 aufgetretenen Mukosablutungen - bei intaktem Endothel der GefäÙe – sind auf die hohe Heparinkonzentration zurückzuführen.

(Eine detaillierte Auswertung, unter Berücksichtigung aller Darmsegmente, erfolgt im Rahmen einer anderen Arbeit – s.o. S.85).

Bei einigen Parametern (z.B. Perfusionswiderstand, Sauerstoffverbrauch) erfolgt die Umrechnung auf 100 g Darmgewicht, um zu einer besseren Vergleichbarkeit zu gelangen. Als **Darmgewicht** wird dabei auch zum Perfusionsende das Nativgewicht ohne Mesenterium herangezogen. Da es im Laufe der Perfusion teilweise zu deutlichen Gewichtszunahmen durch Ödembildung gekommen ist, erscheint der Bezug auf das Nativgewicht ungenau zu sein.

Die am niedrigsten heparinisierte Gruppe 2 weist die stärkste relative Gewichtszunahme auf, und zwar von 94,8 % (Median). Demgegenüber wird in der Gruppe 3 ein Medianwert von 30,4 % erreicht.

Die Bezugnahme auf das Nativgewicht scheint letztendlich weniger problematisch zu sein, weil z.B. mit zunehmender Ödembildung der Strömungswiderstand steigt und somit die bereits durchgängig höheren Perfusionswiderstände in der Gruppe 2 eigentlich noch höher ausfallen müÙten.

6.1.2. Stabilität

Zur Beurteilung der Sensitivität der Heparinisierungskonzepte des Perfusionsmodells sollen die **Gerinnungsparameter** herangezogen werden.

Wegen der Verwendung extrakorporaler Schlauchsysteme ist mit einer Interaktion zwischen dem Medium Blut und den fremden Oberflächenstrukturen zu rechnen. Der Einsatz extrakorporaler Systeme unter Verwendung des Perfusionsmediums Blut setzt eine sichere Antikoagulation voraus.

Bei dem Modell richtete sich die Auswahl der Heparinkonzentration zunächst nach den für die in Hämoperfusionskreisläufen der Niere, des Herzens und der Extremitäten erfolgreich eingesetzten Heparinkonzentrationen (Modersohn, Eddicks et al. 2001; Grosse-Siestrup, Unger et al. 2002; Grosse-Siestrup, Wiemer et al. 2002).

Wegen der **Komplikationen mit Blutungen** in das Darmlumen und Leckagen nach außen, die in den Vorversuchen auftraten, wurden verschiedene Heparinisierungskonzepte entwickelt. Bestandteile dieser Heparinisierungskonzepte waren die schrittweise Reduktion der Heparinkonzentration im Tier sowie im Blutbeutel und das Priming des Schlauchsystems, das nicht nur in der Gruppe 3 (nHep mP), sondern auch in der Kontrollgruppe 4 (nHep mP mCd) durchgeführt wurde.

Auch bei Bypassoperationen konnte durch kovalente chemische Bindung von Heparin an fremde Oberflächenstrukturen die systemische Heparinkonzentration reduziert werden. Die häufigsten Komplikationen, die bei Bypassoperationen auftreten, sind massive Blutungen und die Entwicklung einer Thrombozytopenie (Tashiro, Okamoto et al. 2001).

Über die Effekte der verschiedenen Antikoagulantien auf die Plasmaseparation mittels Kapillarmembranen ist nur wenig bekannt (Omokawa, Malchesky et al. 1988; Reimann and Mason 1990).

UNGER et al. untersuchten *in vitro* den Einfluß verschiedener Heparinkonzentrationen auf die Plasmaseparation unter Verwendung von Kapillarmembranfiltern. In Abhängigkeit von der Versuchsgruppe wurde die Antikoagulation mit unterschiedlichen Heparinkonzentrationen (2,5 IU/ml oder 5 IU/ml) bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass die höheren Heparinkonzentrationen die rheologischen Eigenschaften des Blutes stabilisieren und verlässlichere Daten im Hinblick auf die *in vitro* Plasmafiltration liefern (Unger, Haltern et al. 2003).

Es ist auch zu beachten, dass das hämostatische System unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht herstellt zwischen gerinnungsfördernden Prozessen (Thrombozytenaktivierung und -adhäsion, Aggregation und Gerinnung von Blut und Thrombenbildung) und

gerinnungshemmenden Prozessen (Fibrinolyse), die im Endothel und im Plasma lokalisiert sind. Bereits die Kanülierung der Gefäße führt zu einer vaskulären Schädigung und hat deshalb eine Aktivierung des hämostatischen Systems zur Folge. Diese Aktivierung wird auch durch den Kontakt von Blut mit fremden Oberflächen und Dialysemembranen fortgesetzt (Lane and Bowry 1994), möglicherweise gesteigert.

Der erste Kontakt von Blut mit fremden Oberflächenstrukturen führte auch im Perfusionsmodell zu teilweisen Veränderungen der Gerinnungsparameter. Vor allem in der am niedrigsten heparinisierten Gruppe 2 ist tendenziell ein kontinuierlicher Abfall der **Fibrinogenkonzentration** sowie der **Antithrombin-III-Aktivität** zu erkennen. Die **Thromboplastinzeit** steigt über den Perfusionsverlauf an, während die **ACT** eher konstant verläuft. Hierbei ist zu beachten, dass die ACT in allen Gruppen immer nur zu einer unvollständigen Gerinnung geführt hat und die Auswertung somit nur zu ungenauen Ergebnissen führen konnte. In der Gruppe 2 ist auch ein deutlicher Anstieg der **D-Dimere** zu verzeichnen, während ein signifikanter Abfall der Thrombozyten ausbleibt.

Es wird angenommen, dass vor allem das Verhältnis zwischen den Konzentrationen der verschiedenen Proteinbestandteile, so das Verhältnis zwischen der **Fibrinogen- und Albuminkonzentration**, einen Einfluss auf die Erythrozytenaggregation (Fadul, Linde et al. 1997) und somit auf die rheologischen Eigenschaften des Blutes hat (Rogausch 1987).

In der Gruppe 2 ist wie bei der Fibrinogenkonzentration auch ein tendenzieller Abfall der Protein- und Albuminkonzentration zu verzeichnen. Dass die abnehmende Fibrinogenkonzentration - außer wohl beim Darm #17 - nicht auf eine Hämodilution zurückzuführen ist, zeigt die Hämoglobinkonzentration, die zum Perfusionsende wieder deutlich ansteigt. Dies spricht für eine Hämokonzentration.

D-Dimere sind Fibrinospaltprodukte. Der Anstieg der D-Dimere und der Abfall der Fibrinogenkonzentration weisen darauf hin, dass es in der Gruppe 2 zu einem Verbrauch von Fibrinogen gekommen ist.

Da in der Gruppe 2 kein Priming des Schlauchsystems mit Heparin durchgeführt wurde, führte der Kontakt von Blut mit den fremden Oberflächenstrukturen wahrscheinlich teilweise zu einer Adsorption von Proteinen (Addonizio and Colman 1982).

Dem Prozess der Proteinadsorption folgt die Desorption, und zwar in Abhängigkeit von der Affinität der Proteine (Vroman, Adams et al. 1980). Die Adsorption von Thrombin in seiner aktiven Form führt dabei möglicherweise zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade (Chuang, Mohammad et al. 1980).

Ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal ist die **Leukozytenkonzentration**. Die Leukozytenaktivierung ist der am häufigsten herangezogene Parameter zur Beurteilung der Biokompatibilität extrakorporaler Systeme. Es ist bekannt, dass es auch während der Hämodialyse zur Entstehung von Leukopenien kommt (Gutierrez, Alvestrand et al. 1994). Wie aus der Abbildung 8 zu entnehmen ist, fällt die Leukozytenzahl in allen Gruppen ab. Die Gruppe 2 (nHep oP) weist dabei den höchsten Abfall von 22,2 auf 9,1 Leukozyten/nl auf. Der Abfall gegenüber den baseline-Werten ist nur in dieser Gruppe signifikant (* $p < 0,05$).

Im Rahmen von Bypass-Operationen am Herzen unter Verwendung eines extrakorporalen Kreislaufes wurde eine erhöhte Produktion und Freisetzung von Zytokinen festgestellt. Eine Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten und die Freisetzung freier Sauerstoffradikale durch den Kontakt mit fremden Oberflächenstrukturen wird ebenfalls angenommen (Kamler, Jakob et al. 1997; Zahler, Massoudy et al. 1999).

Der Einfluss derartiger Effekte auf die Mikrozirkulation ist vor allem von großem klinischen Interesse und wurde bereits in verschiedenen Modellen untersucht (Zimmerman, Grisham et al. 1988; Sack, Dollner et al. 2002; Sack and Hagl 2002).

Die Aktivierung der Leukozyten erfolgt über Komplementfaktoren, die beim Kontakt mit der Dialysemembran angeregt werden. Die induzierte Leukopenie führt zu einer erhöhten Adhäsion und Aggregation der Blutbestandteile mit nachfolgender Abwanderung in die Lunge.

Während der Hämodialyse kommt es nur vorübergehend, innerhalb der ersten 30 Minuten, zu einem Abfall der Leukozytenkonzentration (Horl 2002). Da es sich bei unserem Modell um ein *in vitro* Perfusionssystem handelt, kann keine Regenerierung der Leukozyten stattfinden.

Die **Thrombozytenkonzentrationen** weisen in den Gruppen mit Schlauchsystempriming (3 und 4) einen tendenziell konstanten Verlauf auf. In den Gruppen, in denen kein Priming durchgeführt wurde (1 und 2), ist hingegen ein leichter Abfall zu verzeichnen.

Während der Dialyse ist vor allem die Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation verantwortlich für den Abfall der Thrombozytenzahl (Addonizio and Colman 1982). Es ist anzunehmen, dass eine Abnahme der Thrombozytenzahl stattfindet, wenn es an Membranoberflächen zu einer Adhäsion und Zerstörung von Thrombozyten kommt. Dieses Phänomen kann sich auch unabhängig von einer Gerinnungsaktivierung zeigen. Eine Zelladhäsion und -zerstörung begünstigt jedoch die Aktivierung der Gerinnungskaskade (Unger, Haltern et al. 2003).

Der Abfall der Thrombozytenzahl in den Gruppen 1 und 2 ist vielleicht auch zurückzuführen auf eine durch Hämodialysefilter hervorgerufene Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion (Bonomini, Sirolli et al. 1999). Dass der Abfall der Medianwerte dabei relativ gering ausfällt,

ist möglicherweise auf die Verwendung von sterilen Kapillar-Dialyse-Modulen der Firma Fresenius Polysulfone® als Filter zurückzuführen. Denn es wurde beobachtet, dass bei der Verwendung solcher Module nur ein geringer Abfall der Thrombozytenzahl stattfindet. (Muller, Seitz et al. 1998).

Es ist des weiteren anzunehmen, dass die Veränderungen **der Thromboplastinzeit (TPZ), der Fibrinogenkonzentration, der Antithrombin-III-Aktivität und der D-Dimere** in der Gruppe 2 (nHep oP) auf eine Aktivierung des Gerinnungssystems zurückzuführen sind und deswegen auch ein Verbrauch von **Thrombozyten** stattgefunden hat. Die Thrombozytenaggregation spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung.

Einen signifikanten Abfall der Thrombozytenkonzentration konnten wir allerdings nicht feststellen.

6.1.3. Insbesondere: Einfluss von Cadmium auf die Stabilität

Gruppe 4 (nHep mP mCd) diente der Sensitivitätsprüfung des Systems. Der Maltose-Lsg. wurde eine definierte Menge Cadmium als potentieller Interaktionsfaktor der Gerinnung zugeführt. Untersuchungen *in vitro* haben ergeben, dass die Zufuhr von Cadmium in Ratten zu einer Veränderung der normalerweise spindelförmigen Struktur der Thrombozyten führte, eine Thrombozytenaggregation jedoch verhinderte (Kumar, Bose et al. 2001).

Andere Untersuchungen zeigten, dass Cadmium über die Aktivierung von Phospholipiden zu einer Freisetzung des Gerinnungsfaktors-III (Gewebefaktor) führt und somit die Gerinnungskaskade beeinflusst (Carson and Konigsberg 1980).

Die Ergebnisse der Gerinnungsparameter deuten nicht auf Veränderungen hin, die durch Cadmium bedingt sind. Dies erklärt sich möglicherweise daraus, dass nur geringe Cadmiumkonzentrationen hinzugeführt wurden und Cadmium zunächst resorbiert werden muß, um wirken zu können.

6.2. Einfluss der Heparinisierungskonzepte auf Funktion und Stabilität

Die Untersuchung verschiedener Heparinisierungskonzepte zeigte spezifische Einflüsse auf die Funktion und Stabilität der *in vitro* Darmperfusion. Bei der hoch heparinisierten Gruppe 1 kam es bereits während der Perfusion zu Blutungskomplikationen. Demgegenüber wies die am niedrigsten heparinisierte Gruppe 2, bei der zudem kein Priming des Schlauchsystems durchgeführt wurde, instabile Perfusionsverläufe auf.

Die Gruppe 3 (nHep mP) lieferte die stabilsten Perfusionsbedingungen, während gleichzeitig die Funktionsfähigkeit erhalten werden konnte. Bei tendenziell konstanten Verläufen der Gerinnungsparameter sowie hohem Sauerstoffverbrauch und zugleich niedrigen Perfusionswiderständen wurde, einhergehend mit einer geringen Zellschädigung, Maltose gespalten und die entstandene Glukose in hohem Maße resorbiert. Tendenziell deutet das Heparinisierungskonzept dieser Gruppe darauf hin, dass ein Priming des Schlauchsystems wichtig für die Stabilität der Hämoperfusion ist.

Dies zeigt sich auch in der funktionellen Kontrollgruppe 4 (nHep mP mCd). Insgesamt weist diese Gruppe zwar höhere Perfusionswiderstände auf und eine stärker ausgeprägte Hämolyse, was aus dem freien Hämoglobin ersichtlich ist, erbringt aber doch eine gute Resorptionsleistung mit hohem Sauerstoffverbrauch. Die hohen Erythrozyten- und Hämoglobinkonzentrationen bewirken eine insgesamt höhere Viskosität des Blutes. Trotzdem konnte ein konstanter Verlauf der Gerinnung (unter dem Betracht der herangezogenen Parameter) erreicht werden.

Es ist wichtig, weitergehende Untersuchungen mit diesem Heparinisierungskonzept durchzuführen. In Zukunft sollte auch eine Einstellung des Hämoglobins der verschiedenen Spender-tiere auf einen gleichen oder doch nahezu gleichen Wert angestrebt werden, damit Perfusionen besser verglichen und noch weiter standardisiert werden können.

Immer sollte ein Priming des Schlauchsystems durchgeführt werden, um materialabhängige Bioinkompatibilitäten möglichst zu vermeiden. Zur Minimierung solcher Inkompatibilitäten und zur weiteren Optimierung des Systems sollte auch untersucht werden, welche Materialien für derartige Perfusionssysteme besonders gut geeignet sind. Bei der so genannten Carmeda BioActive Surface™-Technologie (CBAS™) ist Heparin zum Beispiel fest in der Oberfläche des Materials verankert (coating). Es ist beschrieben, dass sich Heparin dabei weder von den Oberflächen ablöst und dann in die Blutbahn gelangt, noch verbraucht wird. Das Coating von Heparin scheint dabei auch im Hinblick auf seine antithrombotische und antimikrobielle Wirkung vorteilhaft zu sein (Foley, Barthel et al. 2002). In Langzeitstudien zur

Unterstützung extrakorporaler Lungen- und Herzfunktionen unter Verwendung von Oxygenatoren wurde die CBASTM-Technologie bei gleichzeitig geringer systemischer Gabe von Heparin und auch ganz ohne solche Gabe bereits erfolgreich eingesetzt worden (Bindslev, Eklund et al. 1987; Wendel and Ziemer 1999).

Dagegen ist beim so genannten Priming über den Perfusionszeitraum von 180 Minuten mit einem vergleichsweise erheblichen Verbrauch bzw. Verlust von Heparin zu rechnen. Somit bietet sich an, die Brauchbarkeit der genannten Technologien und Materialien auch im Perfusionsmodell zu prüfen.

Da die isolierte Organperfusion eine Ergänzungsmethode zu Tierversuchen darstellt, ist es von Bedeutung, derartige Modelle zu entwickeln und zu verbessern, um Schlachthoforgane verwenden zu können und dadurch Tierversuche zu minimieren.

Insgesamt stellt das Modell des isoliert hämoperfundierte Jejunums eine viel versprechende Option dar, Fragestellungen in der Grundlagenforschung zu untersuchen.