

4. Methoden

4.1. Gewinnung von filtriertem Erythrozytenperfusat

Die Erythrozyten für das erythrozytenhaltige Perfusat wurden im routinemäßigen Schlachtprozess von Mastkühen nach Punktion der Vena jugularis gewonnen. Bei dieser, sogenannten terminalen Blutentnahme, wurde das Blut möglichst keimfrei in sauberen 1L Weithalsflaschen aus Glas aufgefangen. Das so gewonnene Blut wurde am Schlachthof (Hakenberger-Fleisch GmbH) sofort mit 14% CPD-Puffer versetzt und in einem eisgekühlten Behälter ins Labor transportiert. Das Rinderblut wurde anschließend auf 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Das dreimalige Waschen der Erythrozyten erfolgte in Form von Zentrifugationsschritten mit anschließender Resuspension in physiologischer Kochsalzlösung. Die Zentrifugationen der Erythrozyten wurden für 8 Minuten bei 2500 G durchgeführt. Nach Abschluss des Waschvorgangs wurde die Erythrozytensuspension mittels eines Leukozytenfilters filtriert. Das so aufgereinigte Erythrozytenkonzentrat wurde nochmals zentrifugiert und mit SAG-Mannitol Stabilisationslösung resuspendiert und bei 4°C gelagert.

4.2. Herstellung des Perfusats

Zunächst wurden 2,5 g L-Glutamin in 100 ml Aqua ad injectabilia aufgelöst. Diese Lösung wurde mittels Vakuumpumpe und Bakterienfilter filtriert und sterilisiert. Anschließend wurden damit unter sterilen Bedingungen 400 ml der Elektrolytlösung III auf 500 ml ergänzt. Das so entstandene Perfusat I setzte sich wie folgt zusammen:

Perfusat I

Natriumchlorid	100 mmol/l
Glucose	13,32 mmol/l
HAES (Hydroxyethylstärke)	80 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	1,08 mmol/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1,3 mmol/l
Kaliumchlorid	4,3 mmol/l
Calciumchlorid-Dihydrat	2,4 mmol/l
L-Glutamin	34,2 mmol/l
Osmolarität	286 mosmol
Onkotischer Druck	30 mosmol
Standardbicarbonat	30 mmol/l

Je Versuchstag wurden 90 ml aus der in SAG-Mannitol gelagerten Erythrozyten nochmals abzentrifugiert und gewaschen. Diese wurden nun mit 160 ml des Perfusats I auf 250 ml aufgefüllt. Das so erhaltene erythrozytenhaltige Perfusat II hatte nach Pufferung mit 30 mmol/l Natriumbicarbonat und nach dem Erreichen der Temperatur von 37°C und der Begasung mit Carbogen folgende gemessene Werte:

Perfusat II

Natrium	139,2 ± 0,6 mmol/l
Kalium	4,81 ± 0,04 mmol/l
pH	7,37 ± 0,01
pO ₂	499 ± 6 mmHg
pCO ₂	34,0 ± 0,3 mmHg
Hämoglobin	8,0 ± 0,1 g/dl
Hämatokrit	23,4 ± 0,3 %
Standardbicarbonat	20,0 ± 0,3 mmol/l

MW±SEM (n=18)

4.3. Vorbereitung und Reinigung des Perfusionssystems

Am Anfang jedes Versuches wurde das Schlauchsystem mit 2 Litern steriler Kochsalzlösung (0,9 %) und anschließend mit 1 Liter sterilem Perfusionsmedium I nicht-rezirkulierend durchspült. Als nächstes wurden alle Luftblasen aus dem System entfernt. Das blasenfreie System wurde auf 4 °C abgekühlt und im rezirkulierenden Modus für die Dauer der Organentnahme in Bereitschaft gehalten.

Nach jedem Experiment folgte die Reinigung bestehend aus einer gründlichen Spülung des gesamten Perfusionssystems bei 60 °C unter Zugabe eines Detergens. Anschließend erfolgte die mehrfache Spülung mit demineralisiertem Wasser und die Trocknung durch Ausblasen mit Druckluft. Eine abschließende Sterilisierung des Schlauchsystems wurde mittels des Formaldehyd-Pendelverfahrens erreicht. Die gläsernen Perfusatsgefäße wurden nach der Reinigung mit 200°C Hitze über vier Stunden sterilisiert.

4.4. Tiere

Die verwendeten Tiere waren Sprague-Dawley Ratten der Firma Harlan-Winkelmann mit einem Körpergewicht zwischen 300 und 350 g. Die Tiere wurden mit Standardrattenfutter ernährt.

Das Projekt wurde genehmigt vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit in Berlin (Genehmigungsnummer: T 0050/01).

4.5. Narkose

Die Tiere wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gelassen und hatten freien Zugang zu Wasser.

Die Narkose wurde durch ein Gemisch aus Rompun® (Xylacin), Ketavet® (Ketamin) und Xylocain® (Lidocainhydrochlorid) (2%) angeleitet. Es wurden 28 mg Xylacin, 135 mg Ketamin und 60 mg Lidocain pro Kilogramm Körpergewicht subkutan als Depot verabreicht. Dadurch wurde eine für die Ratte absolut schmerzfreie Durchführung der Laparotomie und der intraabdominellen Präparation ermöglicht.

Über einen Zugang in der Schwanzvene erfolgte die kontinuierliche Volumengabe in Form von 3 ml/h isotonischer Kochsalzlösung. Darüber hinaus konnte über diesen Zugang bei Bedarf Narkosemittel (Xylacin/Ketamin) nachgegeben werden. Feinste Bewegungen der Barthaare (Vibrissen) galten als Zeichen für ein Abflachen der Narkose und wurden mit den Injektionen von Narkosemittel beantwortet.

4.6. Beatmung

Die narkotisierte Ratte wurde mittels Klebestreifen in Rückenlage auf einer ThermoLux® Wärmeunterlage fixiert. Zur Vorbereitung der Tracheotomie erfolgte eine subkutane Injektion von 0,5 ml Xylocain® 2% in die ventrale Halsregion. Danach wurde die Trachea schichtweise unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus freipräpariert und mit einem Ligaturfaden angeschlungen. Nach Eröffnen der Trachea wurde ein Beatmungstubus eingeführt und mit einem Ligaturfaden fixiert. Das Tier wurde mit einem speziellem Kleintierbeatmungsgerät (Inspira-Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus) volumenkontrolliert mit Raumluft beatmet. Beatmungsfrequenz und Zugvolumen wurden von diesem Gerät nach Gewichtseingabe selbst ermittelt. Eine 300 Gramm schwere Ratte erhielt so ein Zugvolumen von 1,8 ml bei einer Frequenz von 73 Atemzügen pro Minute.

4.7. Präparation des Abdomens

Als nächster Schritt erfolgte die Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba. Nach der Eröffnung des Bauchraums wurden auf Höhe des Rippenbogens

lateral zu beiden Seiten Entlastungsschnitte gesetzt. Danach wurde das terminale Ileum aufgesucht.

Das von der Arteria mesenterica superior versorgte Dünndarmsegment wurde so positioniert, dass der Mesenterialansatz ventral die Pankreas leicht erreichbar war. Dabei wurde das terminale Ileumsegment bogenförmig ausgebreitet und teilweise außerhalb der Bauchhöhle abgelegt. Nach Abmessen der gewünschten Länge des Dünndarms in oraler Richtung wurde dieses Darmsegment abgesetzt und in beide Enden je ein Silikonschlauch von 5 mm Durchmesser zur Einbringung der Messsonden eingebunden. Anschließend wurde der Darm skelettiert. Dazu wurden rechts und links des Gefäßstiels mit je vier bis fünf Ligaturen arterielle und venöse Seitenäste, die nicht der Versorgung des ausgewählten Ileumsegmentes dienten, abgebunden (Brell, 2005a). Es resultierte ein Ileumsegment von ca. 15 cm Länge, mit zu diesem Zeitpunkt noch bestehender Blutversorgung durch den Kreislauf der Ratte. Als nächster Schritt wurden am Mesenterialansatz Arteria und Vena mesenterica cranialis dargestellt. Die Arteria mesenterica cranialis wurde mit einer Ligatur (5x0) umstochen und mittels Seldinger-Technik eine Metallkanüle in das Gefäß eingebunden. Anschließend wurde unverzüglich die Perfusion mit einem Fluss von 3 ml/min gestartet. Als Perfusat diente am Anfang das auf 4 °C gekühlte und gepufferte erythrozytenfreie Perfusat I. Zur Kontrolle der Perfusionsqualität wurde die gleichmäßige Entfärbung der Darmwand beobachtet. Die Vena mesenterica cranialis wurde nun ebenfalls mit einer Ligatur (5x0) umstochen und mittels Seldinger Technik eine Metallkanüle eingebunden. Da die Perfusion und auch der venöse Abfluss des Ileums nun unabhängig vom Kreislauf der Ratte waren, wurde das Tier mit einer Überdosis von Narkosemittel und Kalium eingeschläfert. Nach Durchtrennung des Gefäßstiels proximal der beiden eingebundenen Kanülen folgte die vollständige Mobilisierung des präparierten Ileumsegments.

4.8. Organvorbereitung, Versuchsaufbau und Baseline-Phase

Das so präparierte terminale Ileumsegment wurde zunächst gewogen und dann in das beheizbare, mit Pufferlösung (Krebs-Henseleit-Puffer) gefüllte Organgefäß verlagert und die Kanülen in Halterungen positioniert. An die arterielle und venöse Kanüle wurde nun der Perfusionskreislauf angeschlossen. Am Anfang erfolgte die Perfusion bei 4°C mit dem zellfreiem und oxygeniertem Perfusat I. Nach einer 10 minütigen Auswaschphase im nicht-rezirkulierenden Perfusionsmodus wurde auf das erythrozytenhaltige Perfusat II umgestellt und fortan rezirkulierend perfundiert, wobei das venöse Perfusat in das Perfusativorratsgefäß zurückgeleitet wurde.

Beginnend mit einem Fluss von 3ml/min (ca. 30 ml/min*100g) bei 4°C wurde, einhergehend mit der kontinuierlichen Erwärmung des Organs, der Perfusatfluss gesteigert. Am Anfang der Baselineperiode wurde bei 37°C ein durchschnittlicher Fluss von 83 ± 1 ml (n=18) pro Minute und 100g Gewebe erreicht. Nach Erreichen eines „Steady State“ wurde der Perfusatfluss während des Versuchs konstant gehalten. Vor Eintritt in das Organ wurde das Perfusat in einer Wärmespirale erwärmt und durch einen Hohlfaseroxygenator oxygeniert und von überschüssigem Kohlendioxid befreit (Abb. 2). Mittels einer Wärmeaustauscherpumpe wurden über einen Wärmekreislauf die beiden doppelwandigen Perfusativorratsgefäßen, der Oxygenator, das Bad der Wärmespirale und das doppelwandige Organgefäß temperiert, so dass an allen Stationen des Kreislaufs einheitliche Temperaturen vorlagen.

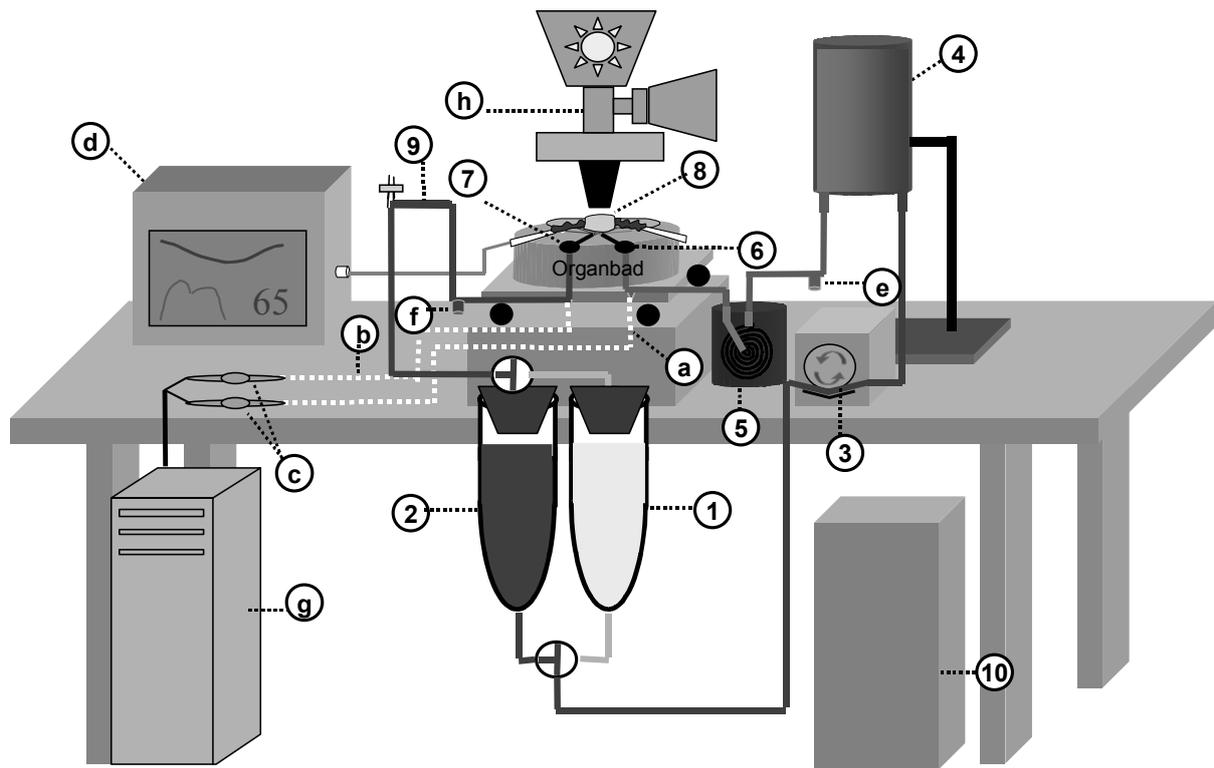


Abb. 2: Isoliertes, vaskulär perfundiertes Ileummodell. Das Ileumsegment befindet sich in einem mit Pufferlösung gefüllten und beheizten Organbad.

- Kreislauf:**
- 1 doppelwandiges Perfusatgefäß mit zellfreiem Perfusat I
 - 2 doppelwandiges Perfusatgefäß mit erythrozytenhaltigem Perfusat II
 - 3 Rollerpumpe für kontinuierlichen Perfusatfluß
 - 4 Hohlfaseroxygenator
 - 5 Wärmespirale in beheiztem Wasserbad
 - 6 Metallkanüle in der Arteria mesenterica superior
 - 7 Metallkanüle in der Vena mesenterica superior
 - 8 Organ (terminales Ileum) mit präsentierter Mucosa
 - 9 höhenverstellbarer venöser Abfluss
 - 10 Wärmepumpe

- Messgeräte:**
- a und b Druckschläuche für arteriellen und venösen Druck
 - c Statham-Druckaufnehmer
 - d Mikrolichtleiter-Photometer (O₂C[®])
 - e und f Entnahmestellen für arterielles und venöses Perfusat
 - g Registrierrechner
 - h Mikroskop mit Kamera und Stroboskoplampe

4.9. Messungen und Registrierung

4.9.1. Druck in der A. mesenterica superior (SMA-Druck [mmHg], kontinuierliche Messung)

Der Blutdruck wurde im arteriellen Schenkel des Kreislaufs mit einem Druckschlauch in Organhöhe aufgenommen und zu den Druckaufnehmern weitergeleitet. Die durch einen Brückenverstärker erzeugte Spannung wurde über einen Analog-Digital-Wandlerkarte auf den Registrierrechner übertragen. Die Datenerfassungssoftware ermittelte nach vorheriger Kalibration (nach Gauer) den Druckwert in mmHg.

4.9.2. Messung der Temperatur

Die Temperatur des isoliertem Organs wurde kontinuierlich von einem im Organbad befindlichen Temperatursensor registriert und im Bereich von 37 ± 0.2 °C konstant gehalten.

4.9.3. Intravitalmikroskopie

Aufbau des Mikroskops

Bei dem verwendeten Mikroskop der Firma Zeiss handelte es sich um ein Auflichtmikroskop, bei dem das Präparat durch das Objektiv beleuchtet wird. Die Verwendung eines 20-fachen Wasserimmersionsobjektivs bedingte eine maximal erreichbare Gewebetiefe von ca. 100 µm. Die Perfusionmessung in der Mucosa beschränkte sich somit auf den Bereich der Villusspitzen und die dort befindlichen Endverzweigungen der Arteriolen („terminal feeding arterioles“).

Die mucosalen Gefäße wurden durch einen intravaskulären Fluoreszenz-Marker erkennbar gemacht. Ein Filterblock diente dazu diese Fluoreszenz sichtbar zu machen. Der Lichtweg von der Lampe auf das Präparat wurde durch einen Bandpassfilter geleitet (Wellenlängenbereich 450 – 490 nm) und das vom Präparat emittierte Licht musste auf dem Weg zur Kamera einen weiteren Bandpassfilter passieren (Wellenlängenbereich 515 – 565 nm). Somit wurde gewährleistet, dass die Wellenlängenbereiche von Anregungslicht und emittiertem Licht streng voneinander getrennt waren und im Präparat nur die Fluoreszenz der Gefäße zu sehen war. Damit wurden unerwünschte Effekte durch Streuung und Reflektion des Anregungslichtes vermindert.

Bei der Kamera handelte es sich um eine hochempfindliche digitale Videokamera. Die Anordnung der für die Intravitalmikroskopie verwendeten Geräte ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Visualisierung mucosaler Mikrogefäße

Das Organ wurde auf der antimesenterialen Seite mit einem Elektrokauter 2 bis 3 cm lang aufgeschnitten und mit der Mucosa nach oben auf eine dafür angefertigte Halterung aus Metal mit aufgetragener Plastilinwulst ausgebreitet. Die Plastilinmasse hielt dabei das Organ in der für die Intravitalmikroskopie gewünschten Position. Dabei wurde die mucosale Seite nach außen gekehrt und dem darüber liegendem Objektiv präsentiert. Das Präparat befand sich im beheizten Organbad auf der Höhe des Flüssigkeitsspiegels und wurde mit einer durchsichtigen haushaltsüblichem Frischhaltefolie abgedeckt, um eine Auskühlung und Austrocknung zu vermeiden.

Das Organbad einschließlich Ileumsegment befand sich auf einem Mikroskopiertisch, der mit computergetrieben Mikroschrauben exakt bewegt werden konnte. Bei jeder durchgeführten intravitalmikroskopischen Untersuchung wurde pro Arbeitsgang eine Anzahl von 20 Ileumvilli erfasst. Hierzu wurde die Darmschleimhaut mit dem Objektiv in Schritten von 100µm nach einem vordefinierten Muster abgefahren.

Das hochmolekulare fluoreszierende FITC-Dextran, welches 20 min vor dem Beginn der Intravitalmikroskopie dem Perfusat zugefügt wurde, diente der Visualisierung der mucosalen Gefäße. Die Erythrozyten wurden durch den Marker nicht angefärbt, so dass leuchtenden „Plasmalücken“ zwischen den Erythrozyten als Bezugspunkte für die Geschwindigkeitsmessungen herangezogen werden konnten.

Videoaufzeichnung und Auswertung

Die am Mikroskop montierte Kamera lieferte ein herkömmliches 50 Hz Videosignal bestehend aus 25 Vollbildern bzw. 50 Halbbildern pro Sekunde, welches auf einem digitalen Videorekorder gespeichert wurde.

Für die zyklische Berechnung der Perfusionsgeschwindigkeiten wurde die Verschiebung von intravaskulären Mustern (dunkle Erythrozyten, helle Plasmalücken) entlang der untersuchten Gefäßachse zwischen aufeinanderfolgenden Halbbildern gemessen (De Vriese, 2000). Eine speziell hierfür entwickelte Software war in der Lage 25 mal pro Sekunde ein intravaskuläres Muster zu speichern und mit dem darauffolgenden Halbbild zu vergleichen, um so die Verschiebung des Musters zu messen (Pries, 1988). So wurden in jedem untersuchten Gefäß innerhalb von 4 Sekunden 100 Geschwindigkeiten gemessen, aus denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Die automatisierte Messung und Auswertung der Erythrozytengeschwindigkeiten erfolgte mit einer von Prof. Axel Pries und Dipl. Ing. Steffan Drüsedow entwickelten Spezialsoftware. In jedem

Organ wurden pro Messzeitpunkt in 20 Villi die Perfusion aufgezeichnet und ausgewertet, so dass bei einer Fallzahl von $n=6$ pro Versuchsgruppe insgesamt 120 Villi zu jedem Versuchszeitpunkt gemessen wurden. Neben dem daraus berechneten Durchschnittswert konnte zusätzlich ein Aussage über das Verteilungsmuster der Mucosaperfusion genauer getroffen werden und so homogener von inhomogener Perfusion unterschieden werden.

Doppelblitzbeleuchtung

Bei der normalerweise verwendeten kontinuierlichen Beleuchtung (Glüh- oder Halogenlampe) kam es durch die Bewegung des Musters während der Bildgenerierung zur unscharfen Darstellung und damit schlechteren Musterwiedererkennung. Der bei einem konventionellen Videosignal standardisierte Zeitabstand zwischen den Halbbildern von 20 ms führte dazu, dass in Abhängigkeit zur betrachteten Gefäßlänge die maximal messbare Geschwindigkeit auf etwa 1 mm/s begrenzt ist, da sich bei höheren Geschwindigkeiten das wiederzuerkennende Muster im folgenden Halbbild aus dem Gefäßabschnitt herausbewegt hat. Der überwiegende Teil, der in dieser Studie zu messenden Geschwindigkeiten lag jedoch über dieser Marke, so dass ein für hohe Perfusionsgeschwindigkeiten optimiertes Verfahren zur Anwendung kommen musste.

Bei der sogenannten Doppelblitztechnik wurde für die Beleuchtung des Präparates eine Lichtbogenlampe, die bei einem Spannungsimpuls einen hellen Lichtblitz erzeugt, verwendet. Die Ansteuerung dieser Stroboskoplampe erfolgte durch zwei kurz hintereinander (2,5 ms) folgende Spannungsimpulse, die von einem speziell dafür ausgelegtem Netzteil bereitgestellt wurden. Durch ein Synchronisationsmodul wurde der Zeitpunkt des Doppelblitzes exakt auf den Halbbildwechsel gelegt. Die Belichtung der Halbbilder erfolgte nur zum Zeitpunkt des Blitzes ($< 1\text{ms}$) und lag bei aufeinander folgenden Halbbildern nur noch 2,5 ms und nicht mehr 20 ms auseinander. So konnten viel höhere Perfusionsgeschwindigkeiten von bis zu 20 mm/s gemessen werden (Lindert, 2002).

Die exakte Einstellung des Doppelblitzes am Synchronisationsmodul erfolgte unter Verwendung einer Fotodiode die in den Lichtweg der Stroboskoplampe eingebracht wurde. Die Spannungsimpulse der Fotodiode und das Videosignal wurden gleichzeitig mit einem Oszilloskop dargestellt.

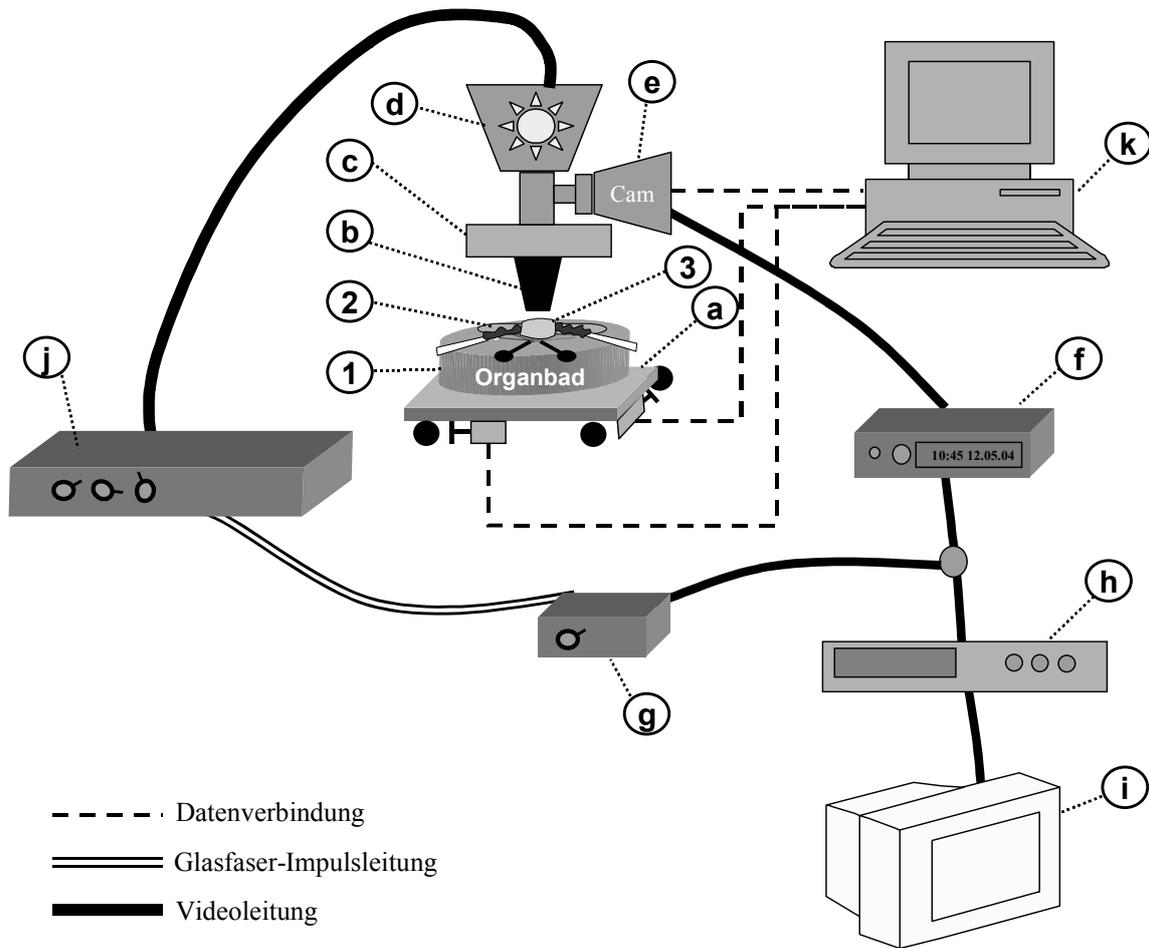


Abb. 3: Aufbau der Intravitalmikroskopie. Mikroskop mit den dazugehörigen Steuerungs- und Registrierungselementen:

1. Temperiertes Organbad
2. Organhalterung mit Plastilininformation
3. Organ (terminales Ileum) mit präsentierter Mucosa
- a. Mittels Steuerungssoftware bewegbarem Arbeitstisch
- b. Mikroskop
- c. Filterblock
- d. Stroboskoplampe
- e. Videokamera
- f. Gerät für Zeitangabe auf dem Videomaterial
- g. Synchronisationsmodul
- h. Videorecorder
- i. Videomonitor
- j. Stromversorgung der Stroboskoplampe
- k. Steuerungscomputer für die Videokamera und den Arbeitstisch

4.9.4. Mucosale Hämoglobinsättigung und relative Hämoglobinkonzentration (mHbO₂ [%]) und mHb_{rel}, kontinuierliche Messung)

Zur Messung der Mucosaperfusion wurde ein Diagnosegerät zur nicht invasiven Bestimmung der Sauerstoffversorgung von durchbluteten Geweben (Firma LEA Medizintechnik, Deutschland) verwendet. Dieses Messgerät arbeitet nach dem Verfahren der sogenannten Remissionsspektrophotometrie, das zuerst von Sato et al. beschrieben wurde (Sato, 1979). Licht definierter Wellenlänge wurde über einen Mikrolichtleiter (Durchmesser 100 µm) in das Gewebe (Darmmucosa) eingestrahlt. Das remittierte Licht wurde über einen zweiten Mikrolichtleiter auf ein Prisma geleitet und spektral zerlegt. Durch mehrere Photomultiplier wurde die Intensität der einzelnen Wellenlängenbereiche gemessen (Abb. 4).

Aus den Differenzen von eingestrahlttem und remittiertem Licht entstand ein Remissionsspektrum, welches in die Spektren für oxygeniertes Hämoglobin (zwei Peaks bei 542 nm und 577 nm) und deoxygeniertes Hämoglobin (ein Peak bei 556 nm) anteilig zerlegt wurde. Mit Hilfe eines Algorithmus konnte daraus der prozentuale Anteil des oxygenierten Hämoglobins (HbO₂) berechnet werden und nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz auch ein relativer Wert für die Gesamthämoglobinkonzentration (Hb_{rel}) ermittelt werden (Leung, 1987).

Aufgrund der Anordnung der Lichtleiter und der geometrischen Eigenschaften der Lichtausbreitung im Gewebe erreichte die Messung eine Tiefe von 100 µm, so dass sich die Messung auf den Bereich des oberen Drittels der Darmvilli beschränkte. Die erreichte Messtiefe stimmte somit mit der Messtiefe der intravitalmikroskopisch gemessenen Mucosaperfusion überein und gewährleistete außerdem, dass ausschließlich kleine Arterien, Kapillaren und Venolen in die Oxygenierungsmessung einbezogen wurden.

Die flexible Messsonde wurde in das orale Ende des Darmlumens eingeführt und die Spitze der Sonde wurde direkt an der Mucosa platziert. Während des Versuches wurde sichergestellt, dass kein Druck durch den Sensor auf die Schleimhaut ausgeübt ist. Das Gerät registrierte und berechnete 10 Spektren pro Sekunde. Zur Begrenzung der Datenmenge wurde jeweils über 20 Spektren gemittelt und somit alle 2 Sekunden ein gemittelttes Spektrum registriert und aufgezeichnet.

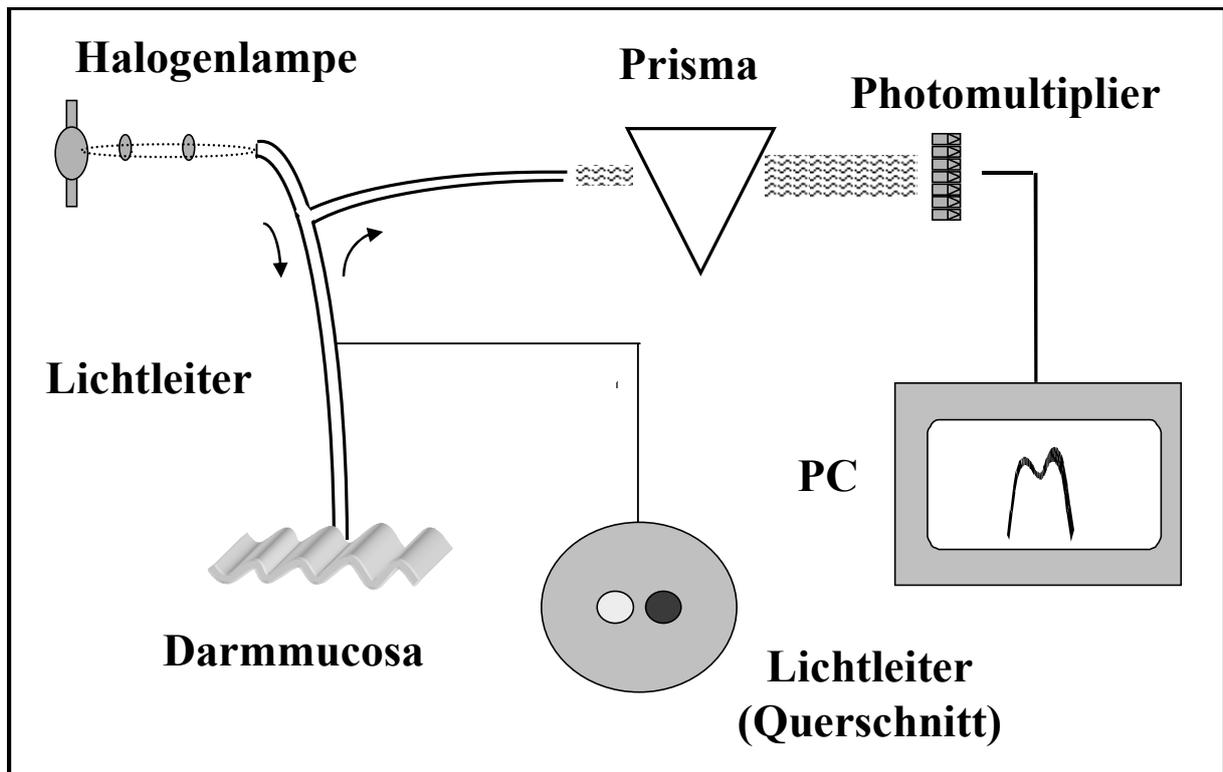


Abb. 4: Funktionsschema der Remissionsspektrophotometrie: Von einer Lichtquelle aus gelangte das Licht über einen Lichtleiter (weiß im Querschnitt) auf die Schleimhaut. Das remittierte Licht wurde über einen zweiten Lichtleiter (schwarz im Querschnitt) auf ein Prisma geleitet und in die spektralen Anteile zerlegt. Die Lichtintensitäten der einzelnen Wellenlängenbereiche wurden getrennt voneinander gemessen und so ein Remissionsspektrum erstellt.

4.9.5. Arterielle und venöse Blutgasanalysen, Berechnung von Sauerstoffaufnahme und Sauerstoffangebot

Im Versuchsablauf wurden arterielle und venöse Blutproben in 20 Minutenintervallen entnommen. Die Bestimmung von Blutgasanalyse (pO_2 , pCO_2 , Standardbicarbonat, pH), Blutbild (Hb, Hk) und Serumelektrolyten (Na, K) erfolgte mit etablierten Standardmethoden, wie sie in Routinelabors verwendet werden. Aus dem arteriellen und venösen Sauerstoffgehalt wurde unter Berücksichtigung von Organgewicht und Perfusatfluß die Sauerstoffaufnahme des Organs berechnet. Für die Bestimmung des Darmgewichtes wurde das Darmlumen vollständig entleert und nur der Darm ohne Mesenterialstiel und Fettgewebe auf eine Feinwaage aufgelegt. Für die Berechnung der Sauerstoffaufnahme (VO_2) wurde der arterielle und venöse Sauerstoffgehalt (Formel 1 und 2) bestimmt und die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ermittelt (Formel 3). Die Sauerstoffaufnahme ist das Produkt der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz und des Perfusatflusses. Aufgrund der unterschiedlichen Gewichte der Ileumsegmente wurde die Sauerstoffaufnahme auf

100 g Gewebe bezogen (Formel 4). Zur Berechnung des Sauerstoffangebotes (DO_2) wurde das Produkt aus dem arteriellen Sauerstoffgehalt und dem Perfusionsfluss gebildet und auf 100 g Organgewicht bezogen (Formel 5). Die Sauerstoffextraktion (O_2X) stellt den Anteil des aufgenommenen Sauerstoffs im Vergleich zum Angebot dar. Sie wurde als Prozentwert angegeben und aus dem Quotienten der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz und des arteriellen Sauerstoffgehaltes ermittelt (Formel 6).

Formel 1: arterieller Sauerstoffgehalt (CaO_2)

$$CaO_2 \text{ [ml O}_2\text{/ml]} = (0,0138 \times Hb \text{ [mg/dl]} \times \text{art. SaO}_2 + PaO_2 \text{ [mmHg]} \times 0,0031) / 100$$

Formel 2: venöser Sauerstoffgehalt (CvO_2)

$$CvO_2 \text{ [ml O}_2\text{/ml]} = (0,0138 \times Hb \text{ [mg/dl]} \times \text{ven. SaO}_2 + PvO_2 \text{ [mmHg]} \times 0,0031) / 100$$

Formel 3: arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ($avDO_2$)

$$AvDO_2 \text{ [ml O}_2\text{/ml]} = CaO_2 - CvO_2$$

Formel 4: Sauerstoffaufnahme (VO_2)

$$VO_2 \text{ [ml O}_2\text{/(min*100g)]} = AvDO_2 \times \text{Perfusatfluss [ml/min]} \times 100 / \text{Organgewicht [g]}$$

Formel 5: Sauerstoffangebot (DO_2)

$$DO_2 \text{ [ml O}_2\text{/(min*100g)]} = CaO_2 \times \text{Perfusatfluss [ml/min]} \times 100 / \text{Organgewicht [g]}$$

Formel 6: Sauerstoffextraktion (O_2X)

$$O_2X \text{ [%]} = AvDO_2 / CaO_2$$

4.9.6. Einschlusskriterien

Die Präparation bis zur Kanülierung der Mesenterialgefäße und Auslösung des Organs aus der Bauchhöhle sollte möglichst zügig erfolgen und nur eine kurze kalte Ischämiephase (<2min) wurde toleriert. Während der 30-minütigen Einlaufphase mussten folgende Bedingungen gewährleistet sein.

1. Der arterielle und der venöse Katheter mussten absolut dicht in die Gefäße eingebunden sein, damit die Geschlossenheit des Perfusionssystems gewährleistet war.

2. Eine homogene Perfusion des Organs mit gleichmäßig rosigem Colorit.
3. Keine Zeichen von Ödem, Blutung oder Blutstauung.
4. Ein stabiler Verlauf aller aufgezeichneten Parameter.
5. Keine Blutung am Schnitttrand der präsentierten Ileummucosa

Alle Organpräparationen, die von diesen Kriterien abweichen, wurden von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

4.10. Experimentelles Protokoll

Es wurden folgende Versuchsgruppen gebildet (n=6 pro Gruppe):

- a. **Kontrollgruppe:** Organe die eine kontinuierliche Infusion von PBS erhalten haben
- b. **α -tox-Gruppe:** Organe die mit einer kontinuierlichen Infusion von α -Toxin (0,05 μ g/ml) behandelt wurden
- c. **α -tox+ADM-Gruppe:** Organe die mit einer kontinuierlichen Infusion von α -Toxin (0,05 μ g/ml) behandelt wurden und 10 Minuten danach mit 0,1 μ M Adrenomedullin therapiert wurden

Nach Beginn der Organperfusion wurde ein Zeitintervall von 50 Minuten eingehalten, um einen „Steady State“-Zustand herzustellen. Das vom Gesamtorganismus abgetrennte und damit denervierte Organ zeigte aufgrund der weggefallenen sympathischen Suppression der Darmperistaltik eine gesteigerte Motilität. Die verstärkte Peristaltik machte das Fokussieren einzelner Mikrogefäße über einen Zeitraum von mehreren Sekunden unmöglich. Um eine Hemmung der Darmperistaltik zu erreichen wurde die fehlende sympathomimetische Wirkung durch die standardisierte Gabe von Isoproterenol Hydrochlorid (50 ng/ml), einem β 1 und β 2 Rezeptoragonisten, imitiert. Zwanzig Minuten vor dem ersten Mikroskopiedurchlauf wurde durch Infusion von FITC-Dextran (0.04 mg/ml) das Blutplasma zum Fluoreszieren gebracht. Nach Abschluss der Stabilisierungsphase wurden die Messparameter über 20 Minuten aufgezeichnet und ein Mikroskopiedurchlauf gestartet. Anschließend wurde die Infusion von 0.05 μ g/ml α -Toxin begonnen und bis zum Versuchende beibehalten. Zehn Minuten nach Beginn der α -Toxin-Infusion wurde in der Gruppe c) mit der fortlaufenden Adrenomedullin-Infusion begonnen. Die Applikationen von α -Toxin und Adrenomedullin wurde mittels Perfusor vorgenommen. Hierzu wurde die Substanz zunächst in

100-facher Konzentration gelöst und mit einer Förderrate entsprechend 1% des Organflusses infundiert. In den Kontrollversuchen wurde in gleicher Weise nur das Lösungsmittel (PBS) zugeführt. Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurde ab Versuchsbeginn der venöse Rückfluss an dem Perfusatvorratsgefäß vorbeigeleitet, so dass eine Anreicherung der kontinuierlich applizierten Substanzen im Perfusionsmedium ausgeschlossen wurde. In allen drei Gruppen erfolgte die Entnahme von Blutproben für Blutgasanalyse sowie Elektrolyt- und Blutbildbestimmungen zu definierten Zeitpunkten (Abb. 5).

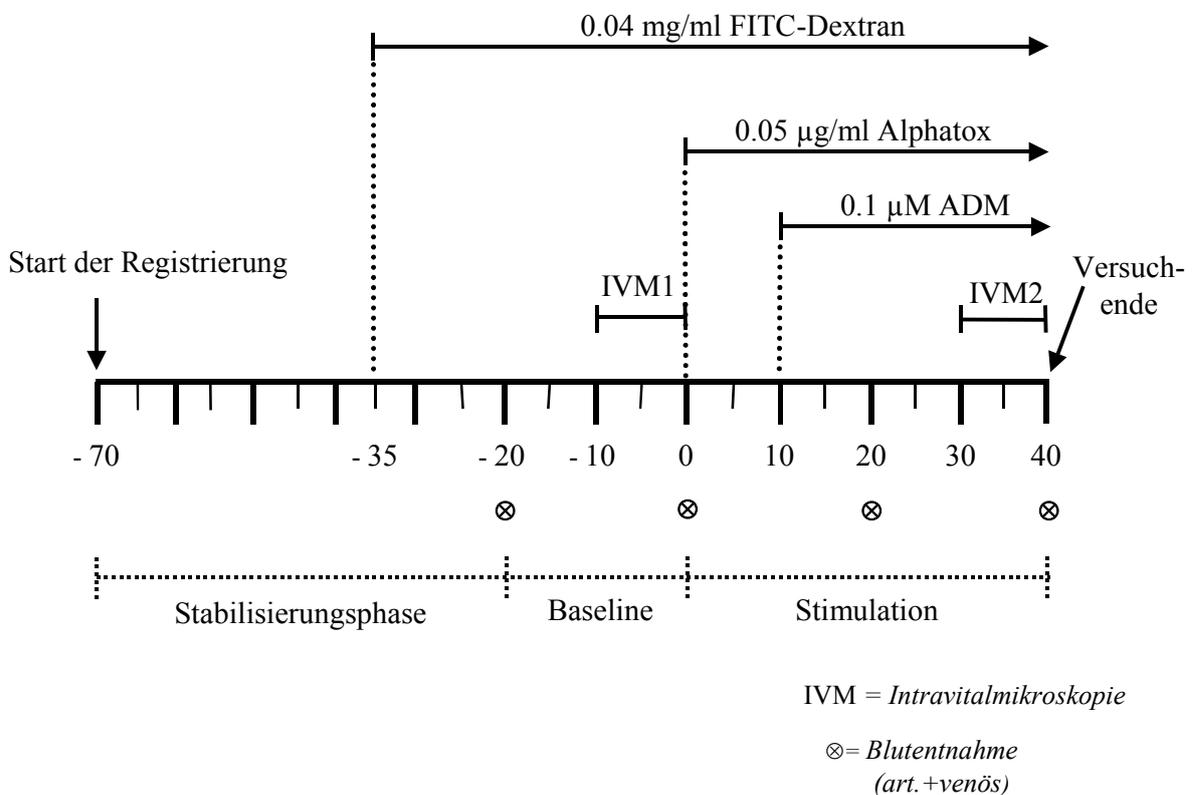


Abb. 5: Schematische Übersicht des Versuchsverlaufes (Gruppen a,b,c). Die kontinuierliche Datenerfassung (SMA-Druck [mmHg], mucosaler HbO₂ [%] und Hb_{rel}) erfolgte über den gesamten Versuchsverlauf. Arterielle und venöse Perfusatproben (pO₂, pCO₂, Standardbicarbonat, pH, Hb, Hk, K, Na,) wurden ab dem Beginn der Baselineperiode in Intervallen von 20 Minuten entnommen. Es wurden je Versuch zwei intravitalmikroskopische Untersuchungen (IVM 1 und 2) durchgeführt.

4.11. Registrierung und Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte durch einen PC unter Windows 95. Die PC war mit einer Analog-Digital-Wandlerkarte und mit der Datenerfassungssoftware Labtech Notebook[®] ausgerüstet. Während des Versuchs wurden diese Daten auf dem Monitor dargestellt und gleichzeitig als Datei im ASCII-Format einmal pro Sekunde auf der Festplatte abgelegt. Zu den jeweiligen Ablesezeitpunkten wurden die Werte in eine Excel[®]-Tabelle übertragen und Versuche der gleichen Reihe nebeneinandergestellt. Auf diese Weise konnten Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes berechnet werden. Zur weiteren Verarbeitung und graphischen Darstellung aller Daten dienten die Programme Excel 2000 (Microsoft[®] Corporation) und PlotIt, Version 3.2 (Scientific Programme Enterprise, Haslett, USA).

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS, Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes, n=6) angegeben. Für die Daten in den Abbildungen 6, 10-12 und in Tabelle 2 kamen nichtparametrische Tests zur Anwendung. Intraindividuelle Vergleiche zwischen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurden mit einem Wilcoxon Signed Rank Test durchgeführt. Interindividuelle Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen wurde mit einem Kruskal-Wallis Test vorgenommen und im Falle von Signifikanzen ein Mann-Whitney Paarvergleich angehängt.

Die an den Gefäßen gemessene Blutflussgeschwindigkeiten und Gefäßdurchmesser entstammten einem Mittelungsprozess, daher konnte aufgrund des „Central Limit Theorems“ a priori von einer Normalverteilung ausgegangen werden. So konnten für die Abbildungen 7-9 parametrische Tests durchgeführt werden. Dabei kam für intraindividuelle Vergleiche ein t-Test für abhängige Stichproben und für interindividuelle Vergleiche eine One-way ANOVA mit Tukey's post hoc Mehrfachvergleichen zur Anwendung.