

**Untersuchungen zur intestinalen Verträglichkeit von
Hydroxyethylstärke
Etablierung und Validierung eines neuen isoliert perfundierten
Mausdünndarm-Modells**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Yuk Lung Wong
Kiel, 2013

Referent: Prof. Dr. Thomas Roeder

Korreferent: PD. Dr. Martin Albrecht

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2014

zum Druck genehmigt: 26.02.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	13
Abkürzungsverzeichnis	14
1. Einleitung	15
1.1. Dünndarm.....	15
1.1.1. Anatomie und Morphologie.....	15
1.1.2. Physiologie.....	16
1.1.3. Die epitheliale und endotheliale Barriere.....	17
1.2. Osmotischer und kolloidosmotischer Druck.....	18
1.3. Klinisch eingesetzte Flüssigkeits- und Volumenersatzmittel.....	20
1.3.1. Kristalloide Lösungen.....	20
1.3.1.1. Balancierte Lösung.....	20
1.3.1.2. Isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl).....	21
1.3.1.3. Ringer-Laktat/Acetat Lösung.....	21
1.3.2. Kolloidale Lösungen.....	22
1.3.2.1. Humanalbumin.....	22
1.3.2.2. Synthetische Kolloide.....	22
1.3.2.2.1. Hydroxyethylstärke (HES).....	23
1.3.2.2.2. Dextran.....	24
1.3.2.2.3. Gelatine.....	24
1.4. Klinische Schockzustände mit indizierter Infusionstherapie.....	25
1.4.1. Hypovolämischer und hämorrhagischer Schock.....	25
1.4.2. Septischer Schock.....	25
1.5. Diskussionen zu HES als Volumenersatzlösung.....	25
1.6. Modelle zur Untersuchung von Änderungen der intestinalen Permeabilität.....	26

1.6.1. <i>In vitro</i> Modelle.....	26
1.6.2. <i>In vivo/ in situ</i> Modelle.....	27
1.6.3. <i>Ex vivo</i> Modelle.....	28
1.7. Ziel der Arbeit	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Vaskuläre Perfusate.....	31
2.1.1. 3 % BSA-Puffer (Krebs-Henseleit-Puffer).....	31
2.1.2. 3 % HES 130/0,4 Puffer (Krebs-Henseleit-Puffer)	32
2.1.3. 3 % HES 200/0,5 Puffer (Krebs-Henseleit-Puffer).....	32
2.1.4. 4 % HES 200/0,5 Puffer (RPMI 1640-Medium).....	32
2.2. Luminales Perfusat	33
2.3. Plättchen aktivierender Faktor (PAF)	33
2.4. Tiere	34
2.5. Methoden.....	34
2.5.1. Messung des kolloidosmotischen Drucks (KOD)	34
2.5.2. Messung der Sauerstoffaufnahme	34
2.5.3. Quantifizierung von FITC-Dextran.....	35
2.5.4. Bestimmung der Pyruvat-Konzentration.....	35
2.5.5. Messung der Galaktose-Konzentration	36
2.5.6. Gewebeaufbereitung für die Bestimmung des Feucht- zu Trockengewichts.....	37
2.5.7. Gewebeaufbereitung für die lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen	37
2.5.8. Histologische Untersuchungen.....	38
2.5.9. Analyse der Darmperistaltik.....	38
2.6. Etablierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells.....	39
2.6.1. Narkose.....	39
2.6.2. Isolation des Maudünndarms	40
2.6.2.1. Besondere Herausforderungen bei der Maus-Präparation.....	41

2.6.3. Perfusionsanlage.....	43
2.6.3.1. Notwendige Modifikationen an der Perfusionsanlage	45
2.6.4. Etablierung der vaskulären Perfusionslösung	47
2.6.5. Etablierung der Perfusionsparameter	47
2.6.6. Modifikation bei Probenentnahme und Messmethoden.....	49
2.6.7. Zusammenfassung (Etablierung).....	49
2.7. Versuchsablauf und Versuchsschemata der Gruppen	50
2.7.1. Ablauf der Isolation des Maudünndarms.....	50
2.7.2. Versuchsschema Validierung	51
2.7.2.1. Kontrollbedingungen.....	51
2.7.2.2. PAF Stimulation.....	51
2.7.3. Versuchsschema Untersuchungen in HES-Gruppen.....	52
2.7.3.1. 3 % HES 130/0,4 und HES 200/0,5 (Krebs-Henseleit-Puffer)	52
2.7.3.2. 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium).....	53
2.7.4. Statistik.....	53
2.7.5. Software	54
3. Ergebnisse	55
3.1. Etablierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells.....	55
3.2. Validierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells	55
3.2.1. Kontrollbedingungen.....	55
3.2.1.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck	56
3.2.1.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss	57
3.2.1.3. Barrierefunktion	58
3.2.1.4. Gewichtsveränderungen des Darms während der Perfusion.....	60
3.2.1.5. Luminale Galaktoseaufnahme	60
3.2.1.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme	61
3.2.1.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht	63
3.2.1.8. Histomorphologische Auswertung	63

3.2.1.9. Analyse der Darmperistaltik.....	64
3.2.1.10. Zusammenfassung (Kontrollbedingungen).....	65
3.2.2. PAF-Stimulation.....	66
3.2.2.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck	66
3.2.2.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss	67
3.2.2.3. Barrierefunktion	68
3.2.2.4. Gewichtsveränderungen des Darms während der Perfusion.....	70
3.2.2.5. Luminale Galaktoseaufnahme	71
3.2.2.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme	72
3.2.2.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht	74
3.2.2.8. Histomorphologische Auswertung.....	74
3.2.2.9. Analyse der Darmperistaltik.....	75
3.2.2.10. Zusammenfassung (PAF-Stimulation).....	76
3.3. Anwendung des Modells	77
3.3.1. 3 % HES 130/0,4 (Krebs-Henseleit-Puffer) als vaskuläres Perfusat.....	77
3.3.1.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck	77
3.3.1.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss	78
3.3.1.3. Barrierefunktion	79
3.3.1.4. Gewichtsveränderungen des Darms während der Perfusion.....	82
3.3.1.5. Luminale Galaktoseaufnahme	83
3.3.1.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme	84
3.3.1.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht	86
3.3.1.8. Histomorphologische Auswertung und elektronenmikroskopische Untersuchungen.	87
3.3.1.9. Analyse der Darmperistaltik.....	88
3.3.1.10. Zusammenfassung (3 % HES 130/0,4)	89
3.3.2. 3 % HES 200/0,5 (Krebs-Henseleit-Puffer) als vaskuläres Perfusat.....	90
3.3.2.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck	90
3.3.2.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss	91

3.3.2.3. Barrierefunktion	92
3.3.2.4. Gewichtsveränderung des Darms während der Perfusion.....	94
3.3.2.5. Luminale Galaktoseaufnahme	95
3.3.2.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme	96
3.3.2.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht	98
3.3.2.8. Histomorphologische Auswertung	99
3.3.2.9. Analyse der Darmperistaltik.....	100
3.3.2.10. Zusammenfassung (3 % HES 200/0,5)	100
3.3.3. 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium) als vaskuläres Perfusat	101
4. Diskussion	102
4.1. Modelletablierung	102
4.1.1. Narkose.....	102
4.1.2. Präparation	103
4.1.3. Perfusionsparameter	104
4.1.4. Sauerstoffaufnahme.....	105
4.1.5. Galaktoseaufnahme	105
4.1.6. Vaskuläre Perfusionslösung	106
4.2. Modellvalidierung	106
4.2.1. Perfusion unter Kontrollbedingungen	106
4.2.2. PAF-Stimulation.....	110
4.3. Untersuchungen am Modell mit HES als vaskulärem Perfusat	112
4.4. Fazit	116
4.5. Ausblick	117
5. Zusammenfassung.....	119
6. Summary	121
7. Anhang	123
8. Literatur	130
9. Danksagung.....	137

10. Curriculum vitae	138
11. Erklärung.....	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Dünndarms.....	16
Abbildung 2: Zellverbindungen des Dünndarmepithels.	18
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Endothels.	18
Abbildung 4: Verhältnis von kolloidosmotische Druck und Filtrationsdruck in der Kapillare.....	20
Abbildung 5: Struktur von HES.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Untersuchungsmöglichkeiten im <i>ex vivo</i> Modell.	29
Abbildung 7: Übersicht nach Entfernung des Dickdarms und Pankreas.	42
Abbildung 8: Präparation der Aorta und <i>Venaportae</i>	43
Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Perfusionskammer und Darstellung des isoliert perfundierten Maudünndarms.....	45
Abbildung 10: Perfusionskammer und der isolierte Maudünndarm in der Kammer.	46
Abbildung 11: Kanülen mit Transporthalterung und die Steuerungsmodule mit Gewichtsmessern.....	46
Abbildung 12: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck bei verschiedenen Perfusionsraten.	48
Abbildung 13: Luminale Galaktoseaufnahme des Darms bei verschiedenen Perfusionsraten.	49
Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf von Narkoseeinleitung bis zum Versuchsbeginn	50
Abbildung 15: Schematischer Ablauf in der Kontrollgruppe.	51
Abbildung 16: Schematischer Ablauf in der PAF-Gruppe.	52
Abbildung 17: Schematischer Ablauf in den HES-Gruppen 130/0,4 und 200/0,5.	52
Abbildung 18: Schematischer Ablauf in den 4 % HES 200/0,5 Gruppe.	53
Abbildung 19: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck.....	56
Abbildung 20: Mittlere venöse, luminale und lymphatische Flussraten.	57
Abbildung 21: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten.....	58
Abbildung 22: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen.....	59
Abbildung 23: Mittlere Gewichtszunahme des Darms.	60
Abbildung 24: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung.	61
Abbildung 25: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis.	61

Abbildung 26: Mittlerer arterieller pH-Wert mit der Standardabweichung.....	62
Abbildung 27: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms.....	62
Abbildung 28: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms.....	63
Abbildung 29: Längsschnitte vom isoliert perfundierten Darm (PAS-Färbung).....	64
Abbildung 30: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion.	64
Abbildung 31: Mittlere Darmmotilität.	65
Abbildung 32: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	67
Abbildung 33: Mittlere venöse, luminale und lymphatische Flussrate mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	68
Abbildung 34: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	69
Abbildung 35: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen in den Effluaten mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	70
Abbildung 36: Mittlere Gewichtszunahme des Darms mit PAF-Stimulation bei Minute 60.....	71
Abbildung 37: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	71
Abbildung 38: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	72
Abbildung 39: Mittlerer arterieller pH-Wert mit PAF-Stimulus bei Minute 60.....	73
Abbildung 40: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	73
Abbildung 41: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms mit PAF-Stimulus im Vergleich zu Kontrollbedingungen.....	74
Abbildung 42: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit PAF-Stimulation.....	75
Abbildung 43: Mittlere Darmmotilität mit PAF-Stimulus bei Minute 60.	75
Abbildung 44: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.	78
Abbildung 45: Mittlere venöse, luminale und lymphatische Flussrate mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.....	79
Abbildung 46: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.....	80

Abbildung 47: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen in den Effluaten mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.....	82
Abbildung 48: Mittlere Gewichtszunahme des Darms mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.	83
Abbildung 49: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.	84
Abbildung 50: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.	85
Abbildung 51: Mittlerer arterieller pH-Wert mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.	85
Abbildung 52: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.	86
Abbildung 53: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms unter Kontrollbedingungen und mit HES 130/0,4 Puffer.....	87
Abbildung 54: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit HES 130/0,4 Puffer.....	87
Abbildung 55: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Darmepithels.....	88
Abbildung 56: Mittlere Darmmotilität mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.....	89
Abbildung 57: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	91
Abbildung 58: Mittlere venöse, luminale und lymphatische Flussrate mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.....	92
Abbildung 59: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.....	93
Abbildung 60: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen in den Effluaten mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer nach Minute 60.	94
Abbildung 61: Mittlere Gewichtszunahme des Darm mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	95
Abbildung 62: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	96
Abbildung 63: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	97

Abbildung 64: Mittlerer arterieller pH-Wert mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	97
Abbildung 65: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	98
Abbildung 66: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms unter Kontrollbedingungen und mit HES 200/0,5 Puffer.	99
Abbildung 67: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit HES 200/0,5 Puffer.	99
Abbildung 68: Mittlere Darmmotilität mit Wechsel zum HES 200/0,5 Puffer bei Minute 60.	100
Abbildung 69: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	123
Abbildung 70: Mittlere venöse, luminale und lymphatische Flussraten (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	123
Abbildung 71: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	124
Abbildung 72: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	125
Abbildung 73: Mittlere Gewichtszunahme des Darms (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	125
Abbildung 74: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	126
Abbildung 75: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	126
Abbildung 76: Mittlerer arterieller pH-Wert mit der Standardabweichung (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	127
Abbildung 77: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).	127
Abbildung 78: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms unter Kontrollbedingungen und mit 4 % HES 200/0,5 RPMI 1640-Puffer.	128
Abbildung 79: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit HES 4 % 200/0,5 RPMI 1640-Puffer.	128
Abbildung 80: Mittlere Darmmotilität (4 % HES 200/0,5 RPMI-1640).	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Plasma und Infusionslösungen.....	21
Tabelle 2: Messbare Parameter im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell	30
Tabelle 3: Konzentration der eingesetzten Chemikalien im modifizierten Krebs- Henseleit-Puffer.	31
Tabelle 4: Konzentration der Chemikalien in der 3 %igen HES-Lösung.....	32
Tabelle 5: Zusammensetzung des 4 % HES 200/0,5 RPMI 1640-Puffers.....	33
Tabelle 6: Konzentration der Substanzen für den luminalen Puffer.	33
Tabelle 7: Modifikationen des Maus-Modells im Vergleich zum Ratten-Modell.	55
Tabelle 8: Kolloidosmotischer Druck der vaskulären Perfusate in Krebs-Henseleit-Puffer..	129

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
BDAS	<i>Basic Data Acquisition Software</i>
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
Caco-2	Humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen
DEX	Dextran
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FZB	Forschungszentrum Borstel
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke
Histoscore	Histologischer Stabilitäts-Score
HSE	Hugo Sachs Elektronik
KOD	Kolloidosmotischer Druck
L/P	Laktat zu Pyruvat Verhältnis
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mittlerer arterieller Druck
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PARP-1	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
RPMI 1640	Zellkulturmedium (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
W/d	Feucht- zu Trockengewicht (<i>wet to dry</i>)

1. Einleitung

Der Einsatz von kolloidalen Volumenersatzlösungen stellt neben der Infusion kristalloider Lösungen, die klassische Therapie bei akutem intravasalem Volumenmangel dar. Dieser Volumenmangel kann durch verschiedene Schockzustände ausgelöst werden, welche durch unterschiedliche Ursachen bedingt sein können. Sowohl die kolloidalen als auch die kristalloiden Lösungen können bei ihrem Einsatz unerwünschte Nebenwirkungen auslösen. Daher ist ein genaues Verständnis über die Wirkungsweise dieser Volumenersatzlösungen im Organismus nötig, um die Risiken im klinischen Einsatz zu minimieren. Die folgenden Abschnitte erläutern den Aufbau und die Funktionsweise des Dünndarms sowie die Wirkungsweise der aktuell klinisch eingesetzten Volumenersatzmittel. Zum Ende der Einleitung werden die Vorteile und Einschränkungen der aktuell verfügbaren Modelle zur intestinalen Untersuchung und die Ziele dieser Arbeit genannt.

1.1. Dünndarm

1.1.1. Anatomie und Morphologie

Der Dünndarm ist ein essentieller Abschnitt des Gastrointestinaltrakts und folgt auf Ösophagus und Magen. Er dient primär der weiteren Spaltung und Resorption über die Nahrung aufgenommener Nährstoffe wie Elektrolyte, Fette, Proteine und Spurenelemente. Diese Aufgaben sind auf drei Abschnitte des Dünndarms verteilt: den proximal gelegenen Zwölffingerdarm *Duodenum*, den mittig gelegenen Leerdarm *Jejunum* und den Krummdarm *Ileum* am distalen Ende. Die Länge des Dünndarms ist stark vom Tonus des Darms abhängig und beträgt im Menschen *in vivo* etwa 3,75 m bzw. 6 m im relaxierten Zustand (*post mortem*). Anteilig beträgt die Länge des *Duodenums* 20-30 cm, des *Jejunums* 1,5 m und des *Ileums*, welches nicht klar abgegrenzt ist, 2 m [1].

Der generelle Aufbau der Wand ist in allen drei Abschnitten gleich. Sie besteht innen aus der Mukosa (*Tunica mucosa*), mit den Teilen Epithel (*Lamina epithelialis*), Lamina propria und der Muscularis mucosae (*Lamina muscularis mucosae*). Darunter befindet sich die Submukosa (*Tela submucosa*) und die Muscularis (*Tunica muscularis*), die wiederum in Ringmuskelschicht (*Stratum circulare*) und Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale*) aufgeteilt ist. Abgeschlossen werden diese Schichten von der Serosa (*Tunica serosa*) (siehe Abbildung 1). Die meisten Abschnitte des Magen-Darm-Traktes sind vom Bauchfell (*Peritoneum viscerale*) überzogen [2].

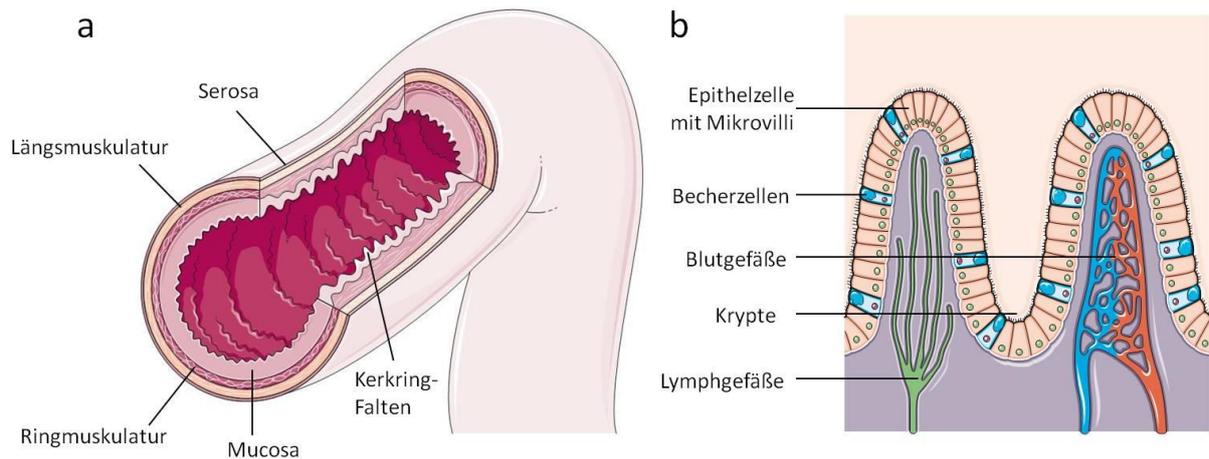


Abbildung 1: Aufbau des Dünndarms.

a Darmquerschnitt mit den verschiedenen Schichten, b Darmzotten mit Blutgefäßversorgung und Krypten.

Im Gegensatz zum Dickdarm bildet die Schleimhaut im gesamten Dünndarm Zotten aus, die aus einer Ausstülpung von Lamina propria und Mukosaepithel bestehen und ins Darmlumen hinein ragen. Sie dienen ebenso der Oberflächenvergrößerung, wie auch die einschichtige, hochprismatische Epithelschicht (Enterozyten) mit apikalem Bürstensaum (Mikrovilli), welche die Zotten überzieht. In diesem Epithel befinden sich vereinzelt schleimbildende Becherzellen, die für den Schutz der Oberfläche und ein verbessertes Gleiten des Nahrungsbreies sorgen. Des Weiteren befinden sich dort verschiedene enteroendokrine Zellen, die Hormone sezernieren, wie z.B. die enterochromaffinen Zellen, die über Serotoninfreisetzung die Darmmotilität steuern.

Zwischen den Zotten befinden sich die Krypten, in denen sich exokrine Paneth-Körnerzellen befinden. Diese setzen Lysozyme und Defensine ins Lumen frei, um das Wachstum von Bakterien und Krankheitserregern zu hemmen [3].

1.1.2. Physiologie

Die im Mund zuvor mechanisch zerkleinerte und mit Enzymen angereicherte Nahrung wird im Magen durch die Magensäure und Pepsin weiter zersetzt und gelangt über den Pylorus in den Dünndarm. Im gesamten Dünndarm sorgt eine stark vergrößerte Oberfläche für eine gute Resorption der Nahrungsbestandteile. Diese Oberflächenvergrößerung beträgt bis zu Faktor 40 und wird durch die Kerckring-Falten, Zotten, Krypten und Mikrovilli erreicht. Das erste und kürzeste Teilstück, das Duodenum, liegt unterhalb des Pylorus und ist für die weitere Spaltung des Nahrungsbreies verantwortlich. In ihn münden sowohl die Ausführgänge der Gallenblase als auch jene des Pankreas.

Zur Neutralisation der Magensäure sezernieren die in der *Tela submucosa* liegenden Brunner-Drüsen Bikarbonat und andere Substanzen wie Muzine und Trypsinaktivatoren.

Ähnlich wie das Duodenum hat auch das Jejunum seine Hauptfunktion in der Spaltung von Nährstoffen, z.B. durch Proteinasen und Amylasen und der Resorption von lipophilen Nährstoffen wie Eiweißen, Fetten, Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen. Der Übergang vom Jejunum zum Ileum ist sowohl morphologisch als auch physiologisch nicht klar abgegrenzt. Wie im gesamten Dünndarm werden im Ileum die Nährstoffe aus der Nahrung resorbiert, insbesondere Lipide inklusive fettlöslicher Vitamine (passiv), Vitamin B12 und Gallensäure (aktiv) [4]. Das Ileum hat neben der Resorption auch wichtige immunologische Aufgaben. Über die Peyer-Plaques werden Antigene aus dem Lumen aufgenommen, weitergeleitet und somit den Zellen der Immunabwehr zugänglich gemacht [3]. Die im Epithel lokalisierten sogenannten M-Zellen sorgen für den Transport der Antigene zu den antigenpräsentierenden Zellen. Diese können die Antigene prozessieren und anschließend auf ihrer Oberfläche präsentieren.

1.1.3. Die epitheliale und endotheliale Barriere

Das Epithel bildet die Grenze zwischen dem Organismus und der Außenwelt. Zudem sind verschiedene Flüssigkeitsräume im Körper durch Epithelien voneinander abgegrenzt. Ein Beispiel für die Barriere nach außen ist das Dünndarmepithel. Die Epithelzellen sind polar aufgebaut und besitzen an der apikalen Seite Schlussleisten und fingerartige Ausstülpungen (Mikrovilli). Die Barrierefunktion wird durch die lateralen Verbindungen zwischen benachbarten Zellen den Tight Junctions, Desmosomen und Konnexonen aufgebaut, welche den parazellulären Fluss von Ionen und Molekülen in den interzellulären Spalt verhindern (Aufbau Abbildung 2). Durch Erkrankungen und andere Noxen wie z.B. Volumenersatzlösungen können epitheliale Barrierestörungen ausgelöst werden.

Die innere Auskleidung der Gefäße besteht aus Endothelzellen [5]. Das Endothel ist im Vergleich zum Darmepithel sehr durchlässig (Abbildung 3) und hält nur Makromoleküle wie Proteine im vaskulären Raum (siehe 1.2). Die Permeabilität wird sowohl von der Durchlässigkeit des Endothels als auch der endothelialen Glykokalyx bestimmt. Schädliche Noxen können auch im vaskulären Endothel zu erhöhter Permeabilität mit zunehmender Extravasation von Makromolekülen und Flüssigkeit ins Interstitium führen [6].

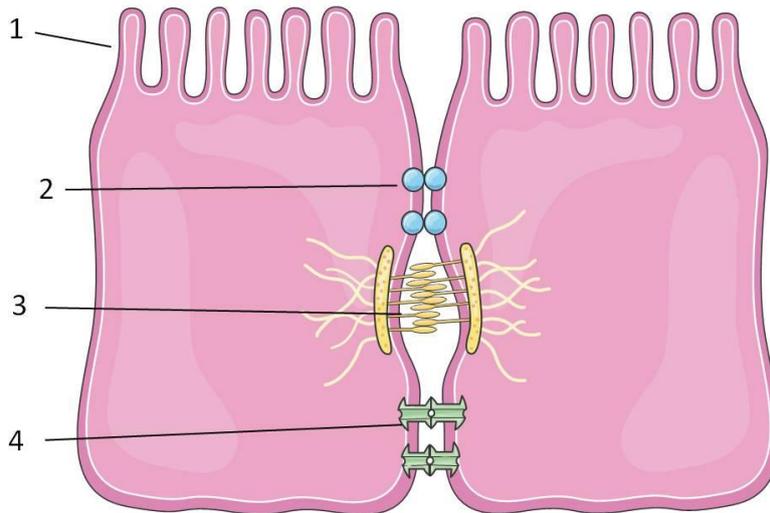


Abbildung 2: Zellverbindungen des Dünndarmepithels.
1 Mikrovilli, 2 Zonula occludens (Tight Junctions), 3 Desmosomen (Adherens Junctions), 4 Konnexone (Gap Junctions).

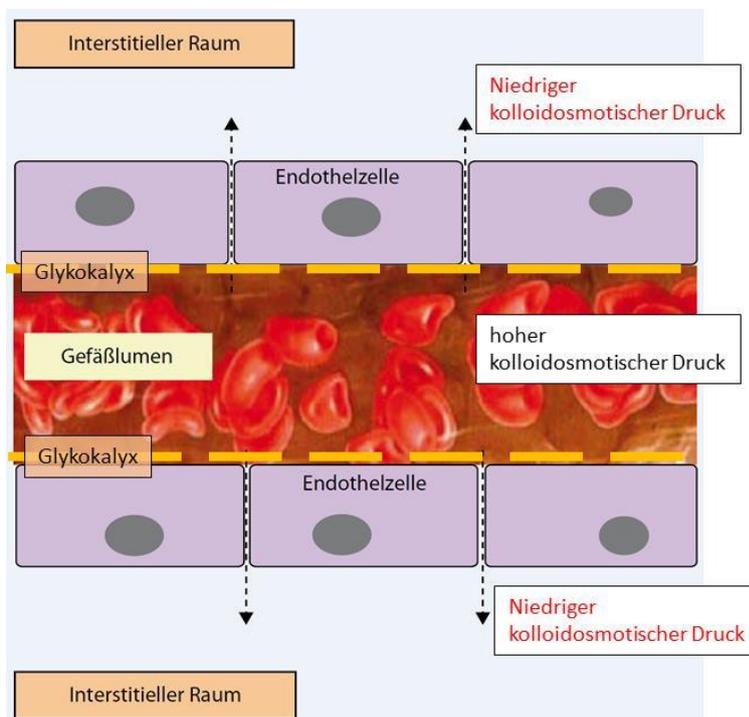


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Endothels.
(Modifiziert nach [6]).

1.2. Osmotischer und kolloidosmotischer Druck

Um die richtige Wahl der Infusionslösung treffen zu können, müssen die grundlegenden Verteilungsvorgänge von kristallinen und kolloidalen Lösungen in den unterschiedlichen Flüssigkeitskompartimenten des menschlichen Körpers betrachtet werden.

Bei Erwachsenen besteht der Organismus zu etwa 60 % aus Wasser, wobei dieses Wasser auf Intrazellularräume und Extrazellularräume verteilt ist. Im Extrazellularraum verteilt sich die

Flüssigkeit auf das Interstitium und den intravasalen Raum. Die Flüssigkeit im Interstitium und die intravasale Flüssigkeit „Plasmawasser“ stehen im Verhältnis 4:1 [7], was bei der Infusionstherapie vor allem bei der Wahl der Infusionslösung von großer Bedeutung ist.

Die Verteilung der Flüssigkeit in den unterschiedlichen Kompartimenten folgt dem Prinzip der Osmose. Die daraus resultierenden Drücke kann man in den osmotischen und kolloidosmotischen Druck aufteilen [8].

Der osmotische Druck beruht auf den Ionengradienten an der Zellmembran. Im Extrazellularraum liegen eine hohe Natrium- und eine niedrige Kaliumkonzentration, im Interzellularraum eine niedrige Natrium- und eine hohe Kaliumkonzentration vor. Dieser Gradient wird durch energie- und sauerstoffabhängige Pumpmechanismen aufrechterhalten und kann bei Unterversorgung zusammenbrechen. Dadurch kommt es dem Konzentrationsgradienten folgend zu einem starken Natriumeinstrom vom extrazellulären Raum in die Zellen. Das Wasser folgt den osmotisch aktiven Ionen und führt zu einem Zellödem mit den assoziierten pathophysiologischen Effekten [9].

Der kolloidosmotische Druck (KOD) ist für die Flüssigkeitsverteilung zwischen dem interstitiellen und intravasalen Raum verantwortlich. Die intakten Kapillarendothelien sind für Elektrolyte gut permeabel, somit können Elektrolyte ungehindert vom Intravasalraum in das Interstitium übertreten. Für Makromoleküle wie Albumin ist das Kapillarendothel nahezu impermeabel und kann somit einen Gradienten zwischen hoher Kolloidkonzentration (intravasal) und niedriger Kolloidkonzentration (Interstitium) aufbauen. Der KOD, welcher zu 80 % von Albumin aufgebaut wird, beträgt intravasal 28 mmHg und im Interstitium 8 mmHg. Diese Differenz erzeugt eine Sogkraft die zum Intravasalraum gerichtet ist und sorgt bei intakter Schrankenfunktion der Kapillaren für eine Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens. Die Differenz im KOD verhindert einen Abfluss vom intravasalen Volumen in den interstitiellen Raum (Abbildung 4). Die Kapillarwand, die den Intravasalraum vom Interstitium trennt, besteht aus einer einzelligen Endothelschicht die über Tight Junctions miteinander verbunden sind. Sie ist für Stoffe mit einem Molekulargewicht von über 30 kDa nicht permeabel. Jedoch ist auch unter physiologischen Bedingungen diese Endothelschicht nicht völlig impermeabel. Bei schweren Schädigungen der Endstrombahn kommt es zum sogenannten Kapillarleck, bei welchem die Schrankenfunktion des Endothels fast vollständig zusammenbricht. Dadurch kommt es zu einem ungehinderten Einstrom von onkotisch wirksamen Molekülen, welcher die interstitielle Ödembildung begünstigt. Neben der pulmonalen ist die intestinale Endstrombahn besonders empfindlich für Flüssigkeitsverschiebungen [7].

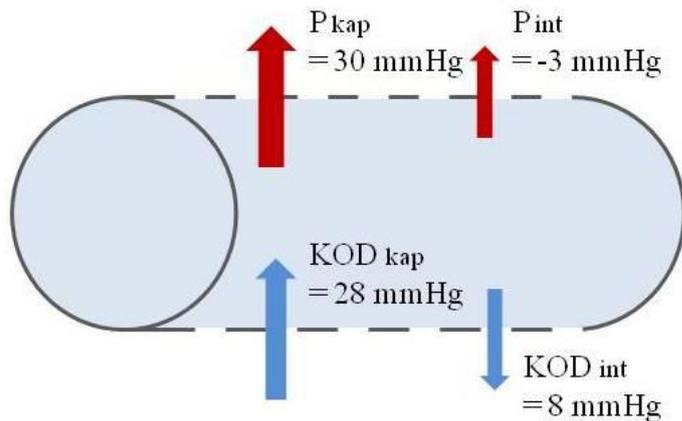


Abbildung 4: Verhältnis von kolloidosmotische Druck und Filtrationsdruck in der Kapillare. P_{kap} Druck in der Kapillare, P_{int} Druck im Interstitium, KOD_{kap} kolloidosmotischer Druck in der Kapillare, KOD_{int} kolloidosmotischer Druck im Interstitium, Filtrationsdrücke (rot), kolloidosmotischer Druck (blau), Pfeile zeigen die Richtung des Druckgefälles zwischen Kapillare und Interstitium an (modifiziert nach [10]).

1.3. Klinisch eingesetzte Flüssigkeits- und Volumenersatzmittel

Bei intravasulärem Volumenmangel wird zur Vermeidung einer Hypovolämie Volumenersatzmittel substituiert [11]. Die Infusion einer kristalloiden Lösung als Flüssigkeitsersatz bewirkt eine gleichmäßige Verteilung der Lösung auf den Intravasalraum und das Interstitium. Kolloidale Lösungen hingegen verteilen sich, aufgrund der geringeren Permeabilität des Endothels für Kolloide, nach einer Infusion fast ausschließlich im Intravasalraum und dienen als Volumenersatz [7]. Somit bestimmt das Therapieziel die Wahl der dafür geeigneten Lösung. Sowohl bei den Kristalloiden als auch bei den Kolloiden gibt es verschiedene Präparate mit unterschiedlichen Elektrolyt- und Kolloidzusammensetzungen, die regional mehr oder weniger häufig in der Klinik eingesetzt werden [7].

1.3.1. Kristalloide Lösungen

Kristalloide sind Elektrolytlösungen ohne kolloidale Bestandteile, die aufgrund ihrer Größe frei durch die Kapillarmembranen diffundieren können. Im Vergleich zu Kolloiden muss die fünffache Menge an Kristalloiden zugeführt werden, um denselben intravasalen Volumeneffekt zu erhalten. Hierdurch entsteht die Gefahr der interstitiellen Überwässerung, was einen entscheidenden Nachteil der Kristalloide darstellt [7].

1.3.1.1. Balancierte Lösung

Die balancierte Lösung hat im klinischen Einsatz die bisherigen Kristalloide größtenteils abgelöst. Ihre Zusammensetzung entspricht weitestgehend der des menschlichen Plasmas und

besteht aus den Kationen Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und den Anionen Chlorid, Acetat und Maltat (Tabelle 1). Für die balancierte Lösung spricht die Isotonie, der physiologische Chloridanteil sowie die Verfügbarkeit von metabolisierbaren Anionen die eine Dilutionsazidose vermeidet [7].

1.3.1.2. Isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl)

Die isotonische Kochsalzlösung hat eine Osmolarität von 308 mosmol/l was sie isoosmotisch zum Plasma macht. Diese Osmolarität wird durch eine unphysiologisch hohe Konzentration an Natrium- und Chloridionen von 154 mmol/l erreicht und beeinträchtigt sowohl die Hämodynamik als auch die Nierenfunktion [7]. Daher wird die isotonische Kochsalzlösung heute meist nur noch zum Spülen und als Trägerlösung von Medikamenten genutzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung von Plasma und Infusionslösungen.
(Modifiziert nach [11]).

Bestandteile	Plasma (mmol/l)	Balancierte Lösung Ringerfundin® (mmol/l)	0,9% NaCl (mmol/l)	Ringer-Acetat (mmol/l)
Na ⁺	142	140	154	130
K ⁺	4,5	4		5
Ca ²⁺	2,5	2,5		1
Mg ²⁺	1,25	1		1
Cl ⁻	103	127	154	112
HCO ₃ ⁻	24			
Phosphat ²⁻	1			
Sulfat ²⁻	0,5			
Organische Säuren	1,5	27		27
Proteinat ⁻	20			
Osmolarität (mosmol/l)	291	304	308	276

1.3.1.3. Ringer-Laktat/Acetat Lösung

Die Ringer-Laktat/Acetat Lösung ist eine Variante der Ringerlösung mit verändertem Elektrolytspektrum und zusätzlichen organischen Anionen wie Laktat oder Acetat. Mit einer Osmolarität von etwa 276 mosmol/l sind beide Lösungen deutlich hypoton. Eine Ringer-Laktat/Acetat Lösung hat mit 130 mmol/l einen zu niedrigen Natrium- und mit 112 mmol/l einen zu hohen Chlorid-Gehalt [11] (Tabelle 1).

1.3.2. Kolloidale Lösungen

In Europa werden zurzeit zur Erhaltung der Normovolämie neben Humanalbumin hauptsächlich drei künstliche Kolloide genutzt. Durch eine intakte Endothelbarriere können Kolloide normalerweise nicht ins Interstitium übertreten. Dadurch erreichen sie im Intravasalraum eine höhere Konzentration als im interstitiellen Raum und können somit Wasser im Gefäßbett binden [9]. Diese onkotische Druckdifferenz wirkt der hydrostatischen Druckdifferenz zwischen intrakapillarem und interstitiellem Druck entgegen und erhält die Flüssigkeit in den Kapillaren [10].

1.3.2.1. Humanalbumin

Im menschlichen Körper wird das Albumin in den Hepatozyten als Proalbumin gebildet. Es besteht aus 580 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 66 kDa. Im Plasma liegt der Albumingehalt zwischen 3,5–5,0 g/dl was 60 % des Gesamteiweißes entspricht. Der größte Teil des Albumins befindet sich mit 60-75 % im Interstitium, insbesondere in der Haut. Im Plasma befinden sich nur 25-40 % des gesamten Albumins, welches hier das intravasale Volumen über den KOD erhält und den Transport von Vitaminen, Spurenelementen, Abbauprodukten, Toxinen und Pharmaka übernimmt. Zusätzlich wirkt Albumin als Radikalfänger und trägt mit bis zu 6 % zur Pufferkapazität des Blutes bei. Täglich können 120-200 mg Albumin pro kg Körpergewicht gebildet werden, was bei einem Erwachsenen 10-15 g beträgt und ca. 4 % der gesamten Albuminmenge des Körpers darstellt. Bei Bedarf ist eine Steigerung der Syntheserate bis auf das Doppelte möglich [7].

Je nach Albumin-Präparat kann der Albumingehalt zwischen 4-25 % variieren. Nach einer Pasteurisierung sind die Albuminlösungen weitestgehend sicher und die im Plasma enthaltenen Viren inaktiviert [9].

1.3.2.2. Synthetische Kolloide

Die synthetischen Kolloide Hydroxyethylstärke (HES), Gelatine und Dextran bieten Vorteile durch ihre Produktionsweise und Zusammensetzung. Neben dem günstigeren Preis und der besseren Lagerungsfähigkeit kann bei synthetischen Kolloiden eine Übertragung von Infektionskrankheiten praktisch ausgeschlossen werden. Fertigungsbedingt liegen diese Kolloide nicht als einheitliches Molekül vor, sondern bestehen aus verschiedenen Molekülgrößen. Daher ist bei den Präparaten das mittlere Molekulargewicht in kDa angegeben, wobei das tatsächliche Molekulargewicht um diesen Mittelwert streut [12].

1.3.2.2.1. Hydroxyethylstärke (HES)

HES ist ein künstlich hergestelltes Polymer, das aus Kartoffel- oder Wachsmaisstärke gewonnen wird. Es besteht aus verzweigten Ketten von Glukosemolekülen mit einer Hydroxyethylierung an verschiedenen Positionen (siehe Abbildung 5), die vor dem enzymatischen Abbau durch die α -Amylase im Blut schützen [7]. Dieser Hydroxyethylierung erzeugt zusätzlich die notwendige Wasserlöslichkeit, indem es die Wasserbindungskapazität des HES erhöht [13]. Zur Charakterisierung von HES-Präparaten wird neben dem mittleren Molekulargewicht auch der Substitutionsgrad angegeben. Der Substitutionsgrad beschreibt hierbei die Anzahl der mit Hydroxyethylgruppen substituierten Glukoseringe im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Glukoseringe im HES-Molekül. Ein höherer Substitutionsgrad verlängert den Zeitraum der Volumenwirksamkeit des HES-Präparats. Erst wenn das HES durch Spaltung ein Molekulargewicht von 60 kDa unterschreitet kommt es zu einer renalen Elimination [9]. Lange Zeit wurde die HES-Variante mit einer Molekülgröße von 200 kDa und einem Substitutionsgrad von 0,5 eingesetzt. Dieses Präparat wurde allmählich durch die neuen HES-Präparate mit 130 kDa und einem Substitutionsgrad von 0,4 ersetzt. Die genannten HES-Varianten sind in Konzentrationen von 6 % bis 10 % in isotoner Kochsalzlösung erhältlich. Im klinischen Einsatz werden heute meist nur noch balancierte HES-Lösungen mit Acetat verabreicht [7]. Der Einsatz von höher konzentrierten HES-Lösungen ist möglich, da HES im Vergleich zu Dextranen und Gelatine eine niedrigere Viskosität besitzt. Eine so niedrige Viskosität wie bei Albumin wird jedoch nicht erreicht [14].

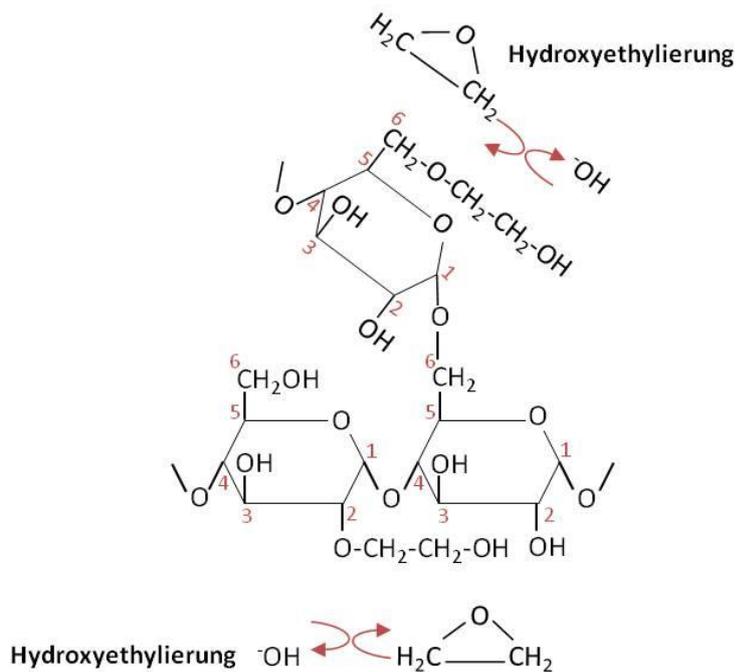


Abbildung 5: Struktur von HES.
(Modifiziert nach [15]).

1.3.2.2.2. Dextran

„Die klinisch eingesetzten Dextrane (DEX) sind Polysaccharide mit einer Länge der α -1-6-glykosidisch verbundenen Glukoseketten von 200-450 Glukosemolekülen“ [9]. Ihre Gewinnung erfolgt durch die Fermentation von glukose- oder fruktosehaltigen Medien durch das Bakterium *Leuconostoc mesenteroides*. Die eingesetzten DEX-Molekülgrößen liegen bei 40, 60 oder 70 kDa, wobei die Präparate meist hyperonkotisch sind. Die körpereigene Dextranase spaltet die Dextrane bis zur Unterschreitung der Nierenschwelle, wonach diese überwiegend renal eliminiert werden [9]. In Deutschland werden DEX-Lösungen aufgrund der Gefahr von schweren Unverträglichkeitsreaktionen kaum noch genutzt [7].

1.3.2.2.3. Gelatine

Gelatinepräparate werden aus den Bändern, Sehnen und Knorpeln speziell gezüchteter Rinder gewonnen. Die Molekülgröße des Kolloids liegt bei 30-35 kDa und somit unterhalb der Nierenschwelle. Eingesetzt werden sie in Konzentrationen von 3,5-5 %. Der Abbau der Gelatine erfolgt durch Peptidasen. Anaphylaktoide Reaktionen sind bei Gelatinepräparaten im Vergleich zu den anderen synthetischen Kolloiden am wahrscheinlichsten zu erwarten (0,345 %), da die Vernetzungsmittel eine Histaminliberation verursachen [9].

1.4. Klinische Schockzustände mit indizierter Infusionstherapie

Je nach der Pathophysiologie des Schockzustandes werden Kolloide oder Kristalloide zur Volumentherapie eingesetzt.

1.4.1. Hypovolämischer und hämorrhagischer Schock

Bei einem hypovolämischen Schock durch äußere oder innere Flüssigkeitsverluste werden balancierte kristalloide Lösungen als Flüssigkeitsersatz empfohlen, wohingegen beim hämorrhagischen Schock durch Blutverlust vorrangig künstliche Kolloide wie z.B. HES als Flüssigkeitsersatz indiziert werden [16].

1.4.2. Septischer Schock

Der septische Schock zeichnet sich durch eine sepsisinduzierte Verteilungsstörung des zirkulierenden Blutvolumens aus. Durch eine Infektion mit gramnegativen oder grampositiven Bakterien bzw. durch ihre toxischen Bestandteile kommt es zu einer Stimulation des Immunsystems, des Endokriniums und zur Aktivierung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren, wie z.B. der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) (siehe 2.3). Diese Dysregulation der Immunantwort führt zu einer gestörten Vasoregulation, Endotheldysfunktion und Distributionsstörung in Makro- und Mikrozirkulation. Es kommt zu einer gesteigerten transkapillaren Flüssigkeitsverschiebung mit Abnahme des intravasalen Volumens und interstitieller Ödembildung. In der Akutphase kann der intravasale Volumenmangel die Substitution von mehreren Litern Volumenersatz erforderlich machen. Der Einsatz von Kolloiden ist in diesem Fall umstritten, da aufgrund des Kapillarlecks ein Teil der infundierten Kolloide in das Interstitium übertritt und das interstitielle Ödem verstärkt. Infundierte Kristalloide hingegen verteilen sich gleichmäßig im Intravasalraum und Interstitium [16].

1.5. Diskussionen zu HES als Volumenersatzlösung

Der klinische Einsatz von HES als Volumenersatzlösung wurde aufgrund aktueller Ergebnisse [17, 18] von der europäischen Arzneimittelagentur (EMA), nach einer Prüfung im Ausschuss für Risikobewertung im Bereich der Pharmakovigilanz, für kritisch kranke Patienten, Patienten mit Sepsis und Verbrennungen nicht empfohlen [19]. In den genannten Studien brachte der Einsatz von HES Infusionen bei Patienten keine Vorteile gegenüber einer Therapie mit Kristalloiden. Vielmehr kam es bei Patienten, die eine HES Infusion erhalten hatten, zu erhöhter Mortalität und vermehrter Behandlung mit Nierenersatztherapie. Nach der

aktuellen Empfehlung soll HES nur noch zur Therapie von Hypovolämie (geringes Blutvolumen) eingesetzt werden, wenn eine Infusion von Kristalloiden alleine nicht ausreicht [20]. Zusätzlich fordert der Ausschuss für Risikobewertung im Bereich der Pharmakovigilanz der EMA von den Pharmaunternehmen weitere Studien zur Anwendung von HES bei Patienten.

1.6. Modelle zur Untersuchung von Änderungen der intestinalen Permeabilität

Die Funktionsfähigkeit des intestinalen Epithels als Barriere zwischen der äußeren Umwelt und dem Körperinneren ist für einen Organismus überlebenswichtig. Es dient neben der Abgrenzung zwischen „innen“ und „außen“ auch als Pforte für die Aufnahme von Nährstoffen, Wasser und Xenobiotika. Die klinische Relevanz ergibt sich durch zahlreiche Erkrankungen, die eine veränderte intestinale Permeabilität aufgrund einer epithelialen Barrierestörung aufweisen. Hierzu gehören Zöliakie [21], Nahrungsmittelallergien [22] und die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Daher ist eine Erweiterung des Wissens zur Barrierefunktion und ihrer Alteration bei pathophysiologischen Vorgängen notwendig, um die Pathogenese und ihre Behandlungsmöglichkeit zu optimieren. Zur Bestimmung der intestinalen Permeabilität und der Transportprozesse werden aktuell verschiedene Modelle genutzt. Neben humanen Caco-2-Zellen für *in vitro* Studien werden auch Darmsegmente von Ratten und Mäusen in *ex vivo* und *in vivo* Versuchen genutzt. Jedes dieser Modelle besitzt Vorteile und Einschränkungen, da sie zur Untersuchung einer spezifischen Fragestellung etabliert und optimiert wurden.

Für die Untersuchung der intestinalen Verträglichkeit von synthetischen Kolloiden wird ein Modell, das neben der Permeabilitätsänderung in der Endothel- und Epithelbarriere auch hämodynamische Veränderungen und weitere wichtige Funktionsparameter abbilden kann, benötigt.

1.6.1. *In vitro* Modelle

In *in vitro* Modellen können Zellen verschiedener Organe und auch Organismen eingesetzt werden. Für die Untersuchungen von intestinalen Absorptionsprozessen können neben isolierten primären intestinalen Epithelzellen auch humane Caco-2-Zellen verwendet werden. Primäre intestinale Epithelzellen sind schwer zu kultivieren und haben eine begrenzte

Lebensdauer [23], daher werden andere leichter zu kultivierende Zelllinien bevorzugt. Besonders Caco-2-Zellen erscheinen für diese Untersuchungen geeignet, da diese - obwohl sie aus dem Colon stammen - Eigenschaften von intestinalen Epithelzellen zeigen. In Kultur differenzieren diese Zellen zu polarisierten epithelialen Zellen mit apikalem Bürstensaum und Tight Junctions zwischen benachbarten Zellen. Auf einer semipermeablen Membran kultiviert können diese Zellen zu Permeabilitätsuntersuchungen, die mit Einschränkungen auf *in vivo* Situationen übertragbar sind, genutzt werden.

In vitro Versuche mit Zellkulturen bieten den Vorteil einer relativ einfachen und schnellen Durchführung mit einer hohen Reproduzierbarkeit. Außerdem steht das apikale wie auch das basolaterale Kompartiment für Untersuchungen zur Verfügung. Jedoch ist die Aussagekraft je nach verwendeter Zelllinie nur eingeschränkt auf die *in vivo* Situation übertragbar, da z.B. die Caco-2-Zelllinie ihren Ursprung im humanen Colon-Adenokarzinom hat. Das Zellmodell bietet als statisches Modell mit einem Zelltyp eine starke Abstraktion von der physiologischen Situation. Für Permeabilitätsuntersuchungen am intestinalen Epithel ist das *in vitro* Zellmodell trotzdem gut geeignet und bietet viele experimentelle Vorteile. Allerdings können damit nur wenige physiologische Faktoren der intestinalen Barrierefunktion abgebildet werden, was seine Einsatzmöglichkeiten einschränkt [24].

1.6.2. *In vivo/ in situ* Modelle

Bei *in vivo/in situ* Versuchen wird das zu untersuchende Organ direkt im Tier manipuliert und Analysen unterzogen. Sehr häufig wird die Ratte als Modell genutzt, womit z.B. die Absorption von oral applizierten Substanzen untersucht werden kann. Möglich sind auch Studien mit abgeschnürten Dünndarmsegmenten, sogenannten „loops“ [25], diese werden mesenterial weiterhin vom Tier mit Blut versorgt und Substanzen können luminal über einen Schlauch perfundiert werden [25, 26] um Permeabilitäts- und Transportprozesse im Dünndarm zu untersuchen. Die Limitierung von *in vivo* Modellen liegt im Versuchsaufbau, da es durch die Vielzahl von Faktoren fast unmöglich wird, den Auslöser einer Permeabilitätsänderung zu identifizieren. Da das zu untersuchende Organ in der Zirkulation des Tieres verbleibt, können von anderen Kompartimenten ausgeschüttete Metabolite und nervale Einflüsse die Versuchsergebnisse beeinflussen. Zwar können für intestinale Untersuchungen einzelne Organe wie z.B. der Magen überbrückt werden, doch führen solche Manipulationen wie auch die Narkose und die Laparotomie zu Veränderungen in der intestinalen Permeabilität [24].

Durch den Anschluss an die Blutzirkulation können im *in vivo/in situ* Modell nicht alle Perfusate kontinuierlich quantifiziert und analysiert werden. Eine kontinuierliche Blutentnahme kommt aufgrund des geringen Blutvolumens vieler Tiere nicht in Frage.

1.6.3. *Ex vivo* Modelle

Bei *ex vivo* Modellen werden die Organe aus dem Tier isoliert und entweder als Ganzes oder nur ein Segment davon für weitere Untersuchungen genutzt. Auch die Perfusionsmethoden der vaskulären und luminalen Kompartimente unterscheiden sich je nach verwendetem Modell stark voneinander.

Das Ussing-Kammer Modell nutzt den Dünndarm als semipermeable Membran, um zwei Kammern voneinander abzugrenzen und den aktiven Ionentransport sowie den Widerstand des Epithels gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Ionen zu untersuchen [27]. Hierbei befindet sich das Darmstück in einer oxygenierten Lösung und wird nicht perfundiert. Ähnliche Modelle nutzen nicht perfundierte Segmente des Dünndarms als Membran zur Untersuchung von pH-Wert- und Permeabilitätsmessungen [28]. Mit diesen Modellen sind Messungen zur Absorption und Passage von Substanzen über die intestinale Barriere möglich. Zudem lassen sich Ionentransporte und Permeabilität des Dünndarms genau untersuchen. Neben der Ussing-Kammer bieten isoliert perfundierte Organmodelle eine weitere Möglichkeit Transportprozesse im Dünndarm *ex vivo* abzubilden.

Ein neues isoliert perfundiertes Rattendünndarm-Modell wurde von Lautenschläger *et al.* [29] etabliert (siehe Abbildung 9). In diesem Modell wird nach einer Laparotomie der Dünndarm einer Ratte isoliert und vaskulär mit einem oxygenierten und modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer mit bovinem Serumalbumin perfundiert. Das vaskuläre Perfusat enthält zusätzlich FITC-Dextran, um Veränderungen in der Permeabilität der Barriere zu untersuchen. Eine Änderung der Barrierefunktion kann über die FITC-Dextran-Konzentration im lymphatischen und luminalen Kompartiment nachgewiesen werden. Das Darmlumen wird separat mit einem Krebs-Henseleit-Puffer mit Zusatz von Laktose perfundiert. Die Laktose wird im Dünndarm durch Laktase in Galaktose und Glukose gespalten und über aktiven Transport von luminal nach vaskulär transportiert. Eine Bestimmung der Galaktosekonzentration im venösen Effluat erlaubt Rückschlüsse auf die metabolische Funktionsfähigkeit des isolierten Rattendünndarms. Neben der Barrierefunktion und Galaktoseaufnahme erlaubt das isoliert perfundierte Rattendünndarm-Modell eine Echtzeitmessung wichtiger Perfusions-Parameter, wie den Druck in Arterie, Vene und Lumen sowie der Flussraten in venösen, lymphatischen und luminalen Kompartimenten. Hervorzuheben ist die einfache Zugriffsmöglichkeit auf die

Perfusate und Effluate während der Perfusion, was eine Intervention und die Probenentnahme für Analysen stark vereinfacht. Das Modell ermöglicht zudem eine präzise Messung von Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb der vaskulären, intestinalen und luminalen Kompartimente während der Perfusion.

Somit eignet sich das *ex vivo* Modell um die intestinale Verträglichkeit von Hydroxyethylstärke zu untersuchen, da viele relevante Parameter bestimmt werden können (siehe Abbildung 6 und Tabelle 2). Um die Vorteile des isoliert perfundierten Dünndarm-Modells zu erweitern, ist eine Portierung von der Ratte zur Maus sinnvoll. Das isoliert perfundierte Maudünndarm-Modell böte für weitere Analysen zahlreiche Analysewerkzeuge, wie Antikörper, ELISA-Kits und *knock out*-Stämme.

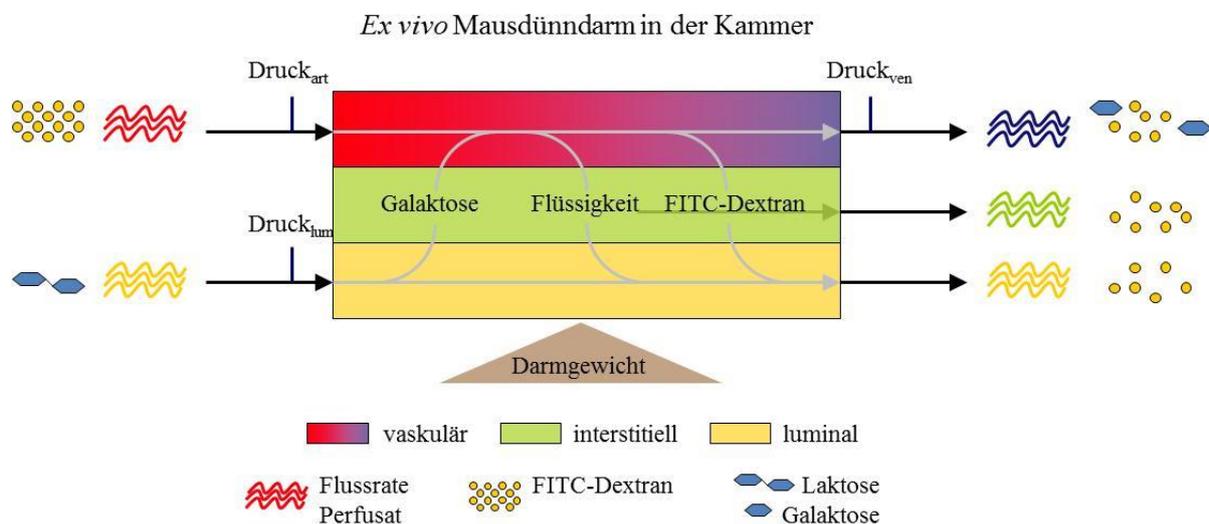


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Untersuchungsmöglichkeiten im *ex vivo* Modell.

Links: einstellbare arterielle und luminaler Flussraten, Laktose- und FITC-Dextrankonzentration vor der Perfusion, rechts: quantifizierbare Flussraten, FITC-Dextran- und Galaktosekonzentrationen in den unterschiedlichen Kompartimenten nach Perfusion, mitte: Flüssigkeits- und FITC-Dextran-Transfers zwischen den Kompartimenten im isolierten Dünndarm, Messung des Darmgewichts in der Kammer, luminal applizierte Laktose nach Spaltung und aktivem Transport aus dem Darm als Galaktose im vaskulären Effluat nachweisbar (modifiziert nach [30]).

Tabelle 2: Messbare Parameter im isoliert perfundierten Dünndarm-Modell.

Bestimmbare Parameter	Echtzeitmessung	Nachträgliche Analysen
Gefäßdruck arteriell, venös, luminal	X	
Perfusionsrate arteriell, luminal	X	
Gewicht Effluat venös, lymphatisch, luminal	X	
O ₂ , CO ₂ Partialdruck arteriell, venös	X	
Laktatkonzentration arteriell, venös	X	
Elektrolytkonzentration arteriell, venös	X	
FITC-Dextran-Konzentration arteriell, venös, luminal		X
Galaktoseaufnahme von luminal nach vaskulär		X
Pyruvatkonzentration vaskulär		X
Histomorphologische Untersuchungen		X
Feucht- zu Trockengewicht		X

1.7. Ziel der Arbeit

Der klinische Einsatz von Hydroxyethylstärke wird aktuell kontrovers diskutiert, da neuere Studien ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis für HES Therapien zeigten [17, 18]. Es existieren aber auch Arbeiten, die positive Effekte von HES auf die Homöostase der vaskulären Barriere aufzeigen konnten [31-33], wobei trotz der hohen klinischen Relevanz des Darms im Rahmen der Ödembildung bei Sepsis die intestinale Wirkung von HES sowie die assoziierten Mechanismen auf die endo- und epitheliale Barrierefunktion bislang kaum erforscht wurden. *In vivo* Untersuchungen zur intestinalen Verträglichkeit von HES sind ungeeignet, da die Bestimmung der relevanten Parameter *in vivo* schwer realisierbar ist. Auch fehlten geeignete *in vitro* und *ex vivo* Modelle, um diese Studie durchzuführen. Deshalb wurde zur Untersuchung ein neues *ex vivo* Maudünndarm-Modell auf Basis des Rattendünndarm-Modells [29] entwickelt. Die Ziele des Projekts bestehen in der Etablierung und Validierung eines neuen isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells und der Untersuchung von pathophysiologischen Veränderungen, die durch eine vaskuläre HES-Perfusion im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell hervorgerufen werden. Hierzu soll der Einfluss einer vaskulären Perfusion mit HES 130/0,4 und HES 200/0,4 auf die intestinale Flüssigkeitshomöostase, die endotheliale und epitheliale Permeabilität, die Histomorphologie und weitere Funktionsparameter (siehe 2.5) untersucht werden.

2. Material und Methoden

Alle verwendeten Substanzen sind, falls nicht anders angegeben, von folgenden Firmen: Sigma-Aldrich, München, Deutschland; PAA, Pasching, Österreich und Sanofis-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland.

2.1. Vaskuläre Perfusate

Alle vaskulären Pufferlösungen mit Ausnahme des 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium) Puffers wurden am Versuchstag frisch angesetzt, auf einen pH-Wert von 7,58 titriert und über Einwegfilter mit 0,22 µm Porengröße sterilfiltriert (Millipore Steritop, Merck, Darmstadt, Deutschland). Kurz vor Perfusionsbeginn wurden $6,7 \cdot 10^{-3}$ mg/l Norepinephrinehydrochlorid (Arterenol, Sanofis-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland) und 40 mg/l Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran zugegeben.

2.1.1. 3 % BSA-Puffer (Krebs-Henseleit-Puffer)

Das vaskuläre bovine Serumalbumin (BSA) -haltige Perfusat für die Kontroll- und PAF-Versuche bestand aus einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer. Zusammen mit dem gefriergetrockneten BSA wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Stoffe in sterilem pyrogenfreiem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gelöst.

Tabelle 3: Konzentration der eingesetzten Chemikalien im modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer.

Laktobionsäure	2 mM
NaCl	95 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
Hepes	12,6 mM
Glukose	7,4 mM
Mannitol	30 mM
CaCl ₂	2,5 mM
NaHCO ₃	25 mM
Glutamin	0,8 mM

2.1.2. 3 % HES 130/0,4-Puffer (Krebs-Henseleit-Puffer)

Das Perfusat bestand wie das 3 %ige BSA-Perfusat auch aus einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (Tabelle 4). Um eine 3 %ige HES-Lösung zu erreichen, wurden die ursprünglichen HES-Präparate 6 % HES 130/0,4 (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) mit sterilem pyrogenfreiem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verdünnt. Da das HES in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung suspendiert war, musste die Menge der NaCl-Zugabe reduziert werden.

Tabelle 4: Konzentration der Chemikalien in der 3 %igen HES-Lösung.

Laktobionsäure	2 mM
NaCl	48,8 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
Hepes	12,6 mM
Glukose	7,4 mM
Mannitol	10 mM
CaCl ₂	2,5 mM
NaHCO ₃	25 mM
Glutamin	0,8 mM

2.1.3. 3 % HES 200/0,5-Puffer (Krebs-Henseleit-Puffer)

Das Perfusat bestand wie das 3 %ige BSA-Perfusat auch aus einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (Tabelle 4). Um eine 3 %ige HES-Lösung zu erreichen, wurden die HES-Präparate 6 % HES 200/0,5 (Serag Wiessner, Naila, Deutschland) mit sterilem pyrogenfreiem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verdünnt. Da das HES-Präparat in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung suspendiert war, musste die Menge der NaCl-Zugabe reduziert werden.

2.1.4. 4 % HES 200/0,5-Puffer (RPMI 1640-Medium)

Der HES-Puffer wurde von Serag Wiessner (Serag Wiessner, Naila, Deutschland) hergestellt und enthielt als Kolloid 4 % HES 200/0,5. Der fertige Puffer setzte sich aus den in Tabelle 5 aufgelisteten Substanzen zusammen und wurde am Versuchstag mit zusätzlichen Komponenten vervollständigt. Auf einen Liter Puffer wurden 10 ml Ultraglutamin 1, 20 ml

MEM Aminosäurekonzentrat 50x, 10 ml MEM Aminosäurekonzentrat 100x und 1,2 g NaCl zugesetzt. Für die Perfusion wurde der Puffer mit einer 2 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 7,58 titriert und über einen Einwegfilter mit 0,22 µm Porengröße (Millipore Steritop, Merck, Darmstadt, Deutschland) sterilfiltriert. Kurz vor Perfusionsbeginn wurden noch die empfindlichen Substanzen $6,7 \cdot 10^{-3}$ mg/l Norepinephrinehydrochlorid und 40 mg/l FITC-Dextran zugegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung des 4 % HES 200/0,5 RPMI 1640-Puffers.

Calciumnitrat 4H ₂ O	0,42 mM
Kaliumchlorid	5,36 mM
Magnesiumsulfat 7H ₂ O	0,4 mM
Natriumchlorid	102,6 mM
Natriumhydrogensulfat	16,65 mM
Dinatriumhydrogenphosphat 12H ₂ O	5,64 mM
Glucose-Monohydrat (Ph.Eur.)	11,09 mM
Glutathion (reduziert)	0,003 mM

2.2. Luminales Perfusat

Das luminale Perfusat enthielt die in Tabelle 6 aufgeführten Substanzen in sterilem pyrogenfreiem Wasser gelöst (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Vor dem Versuch wurde der pH-Wert des Puffers auf 7,58 titriert und mit einem Einwegfilter mit 0,22 µm Porengröße (Millipore Steritop, Merck, Darmstadt, Deutschland) sterilfiltriert.

Tabelle 6: Konzentration der Substanzen für den luminalen Puffer.

NaCl	114 mM
KCl	5 mM
NaHCO ₃	26 mM
Laktose	30 mM
Glukose	5,55 mM
Mannitol	10 mM
Glutamin	0,8 mM

2.3. Plättchen aktivierender Faktor (PAF)

PAF ist der Trivialname für ein natürliches Phospholipid (1-O-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholin). Als ein typischer Mediator der Inflammation löst PAF z.B. im Rahmen einer

Sepsis (siehe 1.2.4.) eine Reihe von physiologischen Funktionsänderungen aus. Um die physiologische Reaktionsfähigkeit des Modells zu verifizieren, wurden in einer Versuchsgruppe 12,5 pmol PAF in 50 µl vaskulärem Puffer aufgelöst und über einen Dreiwegehahn ein vaskulärer Bolus injiziert.

2.4. Tiere

Für die Etablierung und Validierung des Modells wurden Mäuse vom Stamm C57 BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) genutzt. Alle Versuche wurden von den lokalen Behörden genehmigt (Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein) und entsprechend der Tierschutzverordnung durchgeführt. Es wurden weibliche Tiere mit einem Gewicht von 18-20 g eingesetzt, was bei den Tieren einem Alter von 8-10 Wochen entsprach. Die Tiere konnten sich für mindestens 24 Stunden vom Transport erholen und wurden bis zur Organentnahme im hauseigenen Tierstall gehalten. Die Räume waren auf 20-24 °C temperiert, mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Im Tierstall wechselte die Hell- und Dunkelphase alle zwölf Stunden und die Käfige wurden regelmäßig gewechselt. In den Käfigen mit Weichholzfasereinstreu war das Alleinfutter für Ratten und Mäuse (R/M/-H in Pelletform, Sniff, Soest, Deutschland) und mit Ozon aufbereitetes Wasser *ad libitum* verfügbar. Erst eine Stunde vor der Operation wurde das Futter aus dem Käfig entfernt, wobei Wasser weiterhin frei zugänglich war.

2.5. Methoden

2.5.1. Messung des kolloidosmotischen Drucks (KOD)

Zur Bestimmung des KOD der verschiedenen Lösungen wurde ein Onkometer (BMT 923, BMT Messtechnik GmbH, Berlin, Deutschland) genutzt. Das Gerät verfügte über eine semipermeable Membran mit 20 000 Dalton Cut-Off und war somit für die eingesetzten Kolloide undurchlässig und für die Messung geeignet.

2.5.2. Messung der Sauerstoffaufnahme

Die Sauerstoffaufnahme des isolierten Dünndarms wurde aus der Differenz zwischen der arteriellen O₂-Konzentration und der venösen O₂-Konzentration bestimmt. Der Verbrauch wurde dann auf das Trockengewicht relativiert und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{VO}_2 [\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} (\text{Trockengewicht})] = [\text{arterieller PO}_2 (\text{mmHg}) - \text{venöser PO}_2 (\text{mmHg})] \cdot 0,03 (\text{ml O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}) \cdot 0,002 (\text{l/min}) / \text{Trockengewicht (g)}.$$

2.5.3. Quantifizierung von FITC-Dextran

Im vaskulären Puffer wurde FITC-Dextran in einer Konzentration von 40 mg/l als Marker für die Permeabilität des Dünndarms eingesetzt. Das FITC-Dextran hatte ein mittleres Molekulargewicht von 150 000 Dalton und konnte durch seine Größe normalerweise nicht aus dem vaskulären Gefäßbett austreten. Alle 15 min wurden Proben vom vaskulären, luminalen und lymphatischen Effluat genommen und jeweils 50 µl für eine Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. In einem Fluoreszenz-Messgerät (ELISA FL 600 microplate fluorescence Reader, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) wurde das FITC mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 530 nm bestimmt. Die tatsächliche FITC-Dextran-Konzentration in den einzelnen Effluaten wurde mit Hilfe einer Standardreihe bestimmt. In der PAF-Gruppe wurden nach der Stimulation ab 60 Minuten für 15 Minuten luminale und lymphatische Proben in dreiminütigen Abständen genommen, um möglichst engmaschig die Permeabilitätsänderungen zu registrieren.

2.5.4. Bestimmung der Pyruvat-Konzentration

Die im aeroben Metabolismus gebildete Pyruvat-Konzentration wurde mit photometrischen Standardmethoden bestimmt. Das aus Laktat- und Pyruvat-Konzentration berechnete Verhältnis zeigt an, ob ein vorwiegend aerober oder anaerober Stoffwechsel vorliegt.

750 µl des venösen Perfusats wurden mit 375 µl 16 %iger Perchlorsäure gemischt und für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde bis zur Messung bei -20 °C bis zu maximal vier Wochen gelagert. Zur Messung wurden 800 µl der Probe in eine Küvette bei ca. 20 °C mit 400 µl NADH-Lösung versetzt und die Extinktion bei 340 nm in einem Photometer (Helios β, Thermo Electron Corporation, Bremen, Deutschland) gemessen. Für die NADH-Lösung wurden 0,22 mg NADH pro Milliliter Trizma Base aufgelöst. Anschließend wurden 20 µl Laktatdehydrogenase (LDH) 1000 units/ml hinzugefügt und nach vier Minuten die Extinktion mit LDH erneut bestimmt. Die LDH katalysiert hierbei die Reduktion von Pyruvat zu Laktat mit einer gleichzeitigen Oxidation von NAD⁺ zu NADH. Aus der Differenz der Proben zwischen der Extinktion vor und nach der LDH-Gabe und dem Leerwert (Puffer ohne Pyruvat) kann mithilfe des

Extinktionskoeffizienten von NADH die Pyruvat-Konzentration in der Probe bestimmt werden (Berechnung siehe Gleichung).

$$\beta \text{ [mol/l]} = (V \cdot \Delta E) / (\epsilon \cdot d \cdot v) \cdot V_F$$

β : Pyruvat-Konzentration

V: Gesamtvolumen im Assay (1,22 ml)

ΔE : ($\text{Extinktion}_{\text{Probe nach LDH}} - \text{Extinktion}_{\text{Probe ohne LDH}}$) - ($\text{Extinktion}_{\text{Blank mit LDH}} - \text{Extinktion}_{\text{Blank ohne LDH}}$)

E: Extinktionskoeffizient von NADH [6300 l/(mol·cm)]

d: Länge der Küvette (1 cm)

v: Probenvolumen im Assay (0,8 ml)

V_F : Verdünnung der Probe [(750 μl + 375 μl)/750 μl = 1,5]

2.5.5. Messung der Galaktose-Konzentration

Als Marker für die metabolische Aktivität des isoliert perfundierten Dünndarms wurde die aus luminaler Laktose stammende Galaktoseaufnahme ins venöse Kompartiment gemessen und auf das Darmgewicht normiert. Die benötigten Chemikalien stammten größtenteils aus einem kommerziell erhältlichen Analysesystem (Raffinose/Galaktose Assay Kit, Megazyme, Bray, Irland). Die messbare Galaktose stammte aus der enzymatischen Spaltung der luminal applizierten Laktose und dem aktiven Transport von luminal nach vaskulär. Die Galaktose reagiert bei Anwesenheit von NAD^+ mit der D-Galaktose-Dehydrogenase zu NADH und wurde indirekt bestimmt. Durch photometrische Messung konnte die NADH-Konzentration ermittelt und auf die der Galaktose umgerechnet werden (siehe untenstehende Gleichung). 750 μl des venösen Perfusats wurden mit 375 μl 16 %iger Perchlorsäure gemischt und für 10 Minuten bei 3000 G zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde bis zur Messung bei -20°C bis zu maximal vier Wochen gelagert. Daraus wurden 430 μl entnommen und mit 100 μl KHCO_3 2,5 M versetzt, um die Säure zu neutralisieren. Nach der Fällungsreaktion und dem Ausgasen des CO_2 wurden 280 μl aus dem Überstand mit 70 μl Tris/HCl 2 M und 525 μl Aqua *bideest.* in eine Halbmikro-Küvette gegeben. Nachdem 35 μl NAD^+ 8,2 mg/ml hinzugefügt und gut durchmischt wurden, konnte die Extinktion in einem Photometer bei 340 nm bestimmt werden. Anschließend wurden 7 μl D-Galaktose-Dehydrogenase 200 units/ml in die Probe pipettiert und gut durchmischt. Nach 20 Minuten

wurde die Extinktion bei 340 nm erneut gemessen und die Galaktose-Konzentration bestimmt.

$$\beta[\text{mol/l}] = (V \cdot \Delta E) / (\epsilon \cdot d \cdot v) \cdot V_F$$

β : Galaktose-Konzentration

V: Gesamtvolumen im Assay (0,917 ml)

ΔE : ($\text{Extinktion}_{\text{Probe nach LDH}} - \text{Extinktion}_{\text{Probe ohne LDH}}$) - ($\text{Extinktion}_{\text{Blank mit LDH}} - \text{Extinktion}_{\text{Blank ohne LDH}}$)

d: Länge der Küvette (1 cm)

E: Extinktionskoeffizient von NADH [6300 l/(mol·cm)]

v: Probenvolumen im Assay (0,28 ml)

V_F : Verdünnung der Probe [(750 μ l + 375 μ l)/750 μ l · (430 μ l + 100 μ l)/430 μ l = 1,85]

2.5.6. Gewebeaufbereitung für die Bestimmung des Feucht- zu Trockengewichts

Am Ende des Versuchs wurde jeweils am oralen und aboralen Ende des Darms Gewebe für die weitere Aufarbeitung entnommen. Das Gewebe mit direktem Kontakt zur Metallkanüle wurde verworfen. Am aboralen Ende wurde ein 3 cm langes Segment des Darms abgeschnitten und das anhaftende Mesenterium entfernt. Die Flüssigkeit im Lumen wurde mit Wattestäbchen (WAP, Heinz Herenz Hamburg, Hamburg, Deutschland) ausgerollt und der Darm in einem Eppendorf-Gefäß mit 1,5 ml Volumen für 96 Stunden in einem Heizblock bei 55 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Vergleichsstück vom Dünndarm ohne Perfusion wurde direkt nach der Präparation entnommen und auf gleiche Weise getrocknet. Das Feucht- zu Trockengewicht des Dünndarms vor und nach der Perfusion wurde aus dem Gewicht vor der 96 h Trocknung ermittelt. Der Vergleich des Feucht- zu Trockengewichts vor und nach der Perfusion kann darüber Aufschluss geben, ob der Wassergehalt des Gewebes während der isolierten Perfusion angestiegen ist.

2.5.7. Gewebeaufbereitung für die lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde am oralen Ende ein ca. 3 cm langes Stück des perfundierten Dünndarms entnommen, in 4 % Formalin fixiert und in der Pathologie des

Forschungszentrums Borstel (FZB) weiter bearbeitet. Dort wurde das Gewebe mit der PAS-Reaktion gefärbt, welche vor allem kohlenhydrathaltige Komponenten wie z.B. Glykoproteine und Muzine rot-violett färbt und parallel eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie DNA und Zellkerne blau und Eosin die acidophilen Strukturen wie Proteine rot (Protokolle siehe [34]).

Für die elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen wurde das Gewebe aus einem Kontroll- und einem 3 % HES 130/0,4 Versuch nach 135 Minuten entnommen und weiter von der Forschergruppe Mukosale Immunologie und Diagnostik am FZB aufbereitet. Die Proben stammten vom aboralen Ende des isolierten Dünndarms, woraus mehrere Blöcke von der mesenterialen und antimesenterialen Seite geschnitten und umgehend in einer Lösung aus 1:1 1 % Osmiumtetroxid mit 7,5 mg/ml Kaliumhexacyanidoferrat (II) und einer 5 % Lösung aus Glutaraldehyd in Dimethylarsinsäure-Puffer fixiert wurden (Methode siehe [35]). Das Gewebe wurde anschließend über eine Alkoholreihe dehydriert, in Epon eingebettet und die Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat als Kontrastmittel angefertigt. Die EM-Aufnahmen wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM910, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) erstellt.

2.5.8. Histologische Untersuchungen

Die Auswertung der Schnitte erfolgte verblindet mit einem Lichtmikroskop unter 10 bis 20-facher Vergrößerung. Die Beurteilung der Darmzotten (Villi) und insbesondere der Villusspitzen als empfindlichste Strukturen der Mukosa ergab den histologischen Stabilitäts-Score. Für die Zählung wurden Längsschnitte des Dünndarms in Doppelbestimmung verwendet und die Anzahl der Villi mit intakter mukosaler Oberfläche durch die Gesamtanzahl der Villi geteilt (Berechnung siehe Gleichung).

$$\text{Histoscore} = \text{Anzahl intakter Villi} / \text{Gesamtzahl der Villi}$$

2.5.9. Analyse der Darmperistaltik

Die Peristaltik des Darms wurde zum Zeitpunkt 60-61 Minuten und 120-121 Minuten mit einer Videokamera (Ixus 60, Canon, Krefeld, Deutschland) dokumentiert und ausgewertet.

Anhand der Videoaufzeichnungen konnten potentielle Veränderungen der Motilität untersucht werden. Die Motilität des gesamten Dünndarms wurde beobachtet. Für die Untersuchungen der PAF-Gruppe kamen die Zeitabschnitte kurz vor (60-61 min) und nach (62-63 min) der PAF-Gabe zur Untersuchung hinzu. Bei der Zählung wurden die Wiederholungen der

Kontraktionen in einem Dünndarmsegment über eine Minute gezählt. Bei der Auswertung wurde auf die Motilität des gesamten Dünndarms geachtet, wobei für die Zählung der Kontraktionen nur ein kleiner Abschnitt mit 1 cm Länge im mittleren Bereich des isolierten Organs genutzt wurde.

2.6. Etablierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells

2.6.1. Narkose

Zur Narkose wurde Sevofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) als Hypnotikum in Kombination mit Ketamin (WDT, Garbsen, Deutschland) als Analgetikum eingesetzt. Das Tier wurde in eine mit Sevofluran geflutete, abgedunkelte Kammer gebracht und in Narkose versetzt. Sobald das Tier im Toleranzstadium war, wurde mit einer Schermaschine (Aesculap Elektra II, Aesculap, Suhl, Deutschland) das Fell am Bauch und Brustbein entfernt und das Tier anschließend auf einer Waage (EMB 500-1, Kern, Balingen-Frommern, Deutschland) gewogen. Bei der weiteren Narkoseführung erhielt die Maus ein variables Gemisch aus Sauerstoff und Sevofluran über eine Atemmaske. Die Sevofluran-Dosierung musste kontinuierlich angepasst werden, wobei eine Atemfrequenz von zwei Atemzügen pro Minute angestrebt wurde. Eine Erhöhung oder Reduktion der zugeführten Sevofluran-Dosierung konnte innerhalb von wenigen Sekunden die Atemfrequenz des Tieres beeinflussen. Zusätzlich erhielt die Maus zu Präparationsbeginn einmalig 0,05 mg/g Körpergewicht Ketamin als intraperitoneale Injektion. Eine Nachdosierung mit Ketamin war abhängig von der Narkosetiefe und bis zu einer Maximaldosis von 0,05 mg Ketamin pro g Körpergewicht möglich. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde anhand der Abwesenheit des Zwischenzehreflexes und Reaktion auf das Schwanzkneifen mit einer stumpfen Pinzette [36-38] sichergestellt. Hierbei musste eine zu tiefe Narkose vermieden werden, da bei vollständiger Reflexlosigkeit schnell ein Atemstillstand [37, 39] eintreten konnte. Die Kombination von Ketamin und Sevofluran wurde aufgrund ihres synergistischen Effekts gewählt. Die Herzfrequenz senkende Wirkung von Sevofluran [40] wird durch die Herzfrequenz und Blutdruck steigernde Wirkung von Ketamin [41] kompensiert. Um den Flüssigkeitsverlust während der Präparation auszugleichen, wurde den Tieren nach der Narkoseeinleitung 0,8 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung subkutan substituiert. Nach der Isolation des Dünndarms wurde das Tier durch zerebrale Dislokation getötet.

2.6.2. Isolation des Maudünndarms

Die Maus wurde unter einer Heizlampe auf einer Operationsunterlage fixiert und die Narkosemaske angelegt. Nach der abgeschlossenen Narkoseeinleitung fand die Laparotomie statt. Das Operationsfeld konnte durch laterale Schnitte im Bauchfell erweitert werden, wobei wenige Gefäße verletzt werden sollten. Zur besseren Darstellung der Gefäße wurde ein Operationsmikroskop (Leica M651, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) während der gesamten Präparation genutzt. Mögliche Blutungen konnten durch Koagulation (Radiotom 804C, Siemens, München, Deutschland) und Vliesstoffkompressen (Fuhrmann, Köln, Deutschland) gestillt werden. Zunächst wurde der Dickdarm vom Rectum bis zum kranialen Ende des Caecums entfernt und alle Gefäße, die den Dickdarm aus mesenterialer Richtung versorgen, mit einem feinen Seidenfaden ligiert (Rankers Medizinbedarf, Bad Lippspringe, Deutschland) und durchtrennt. Zuletzt wird das Darmrohr vor dem Caecum und am Rectum durchtrennt und entfernt. Der verbleibende Dünndarm musste für die weitere Präparation auf die linke Seite verlagert werden, um das Operationsfeld für die Ligatur der Nierenarterie und der dorsalen Abgänge der Aorta zu schaffen. Anschließend konnte der Darm für die Präparation des Pankreasgewebes vorsichtig auf die rechte Seite platziert werden. Ein Großteil des Duodenums wurde zusammen mit dem dazugehörigen Pankreasgewebe zur mesenterialen Seite ligiert und abgetrennt. Hierfür kamen neben Seidenfäden auch der Coagulator sowie Titan-Gefäßclips (Größe: small, Vitaltech International, Balgheim, Deutschland) zum Einsatz. Verbliebene Abgänge der *Aorta abdominalis* wurden geschlossen und die Portalvene cranial für die Kanülierung freigelegt. Kurz vor der Kanülierung der Aorta, Portalvene und des Darmlumens wurde der Kanülierungsblock (Aufbau der Anlage Abbildung 9) inklusive der Transportvorrichtung in Position gebracht. Dieser musste sich genau oberhalb der zu kanülierenden Gefäße befinden, um eine möglichst kurze Ischämiezeit zu erreichen. Nachdem der Kanülierungsblock mit den Kanülen in Position gebracht wurde, musste die *Aorta abdominalis* unterhalb der *Arteria mesenterica* ligiert werden, um die Blutzirkulation ausschließlich auf den Dünndarm zu beschränken. Anschließend wurde die Aorta kranial mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und längs eingeschnitten. Durch diese Öffnung konnte die arterielle Kanüle eingeführt und mit einer Ligatur fixiert werden. Über diese Kanüle wurde der isolierte Darm mit einer oxygenierten Pufferlösung (siehe 2.1) und einer Perfusionsrate von 2 ml/min vaskulär versorgt. Die venöse Kanüle wurde durch eine Öffnung in der Portalvene eingeschoben und fixiert, wodurch der infundierte Puffer abfließen konnte. Das orale Ende des Darmlumens konnte anschließend auf die luminale Kanüle gezogen, befestigt und der Nahrungsbrei mit dem luminalen Perfusat ausgespült werden.

Anschließend wurden Portalvene und Aorta vom Tier getrennt, der Darm auf die Transportvorrichtung geschoben und in die Versuchskammer transportiert. Dort wurde der Darm zusammen mit der Transportvorrichtung auf die integrierte Waage gelegt und das Ende des Darms auf die aborale luminale Kanüle gezogen und fixiert. Die Kammer konnte nach einer gründlichen Spülung der Darmschleimhaut verschlossen werden. Nach einer Equilibrierungsphase von 27 Minuten wurde der Versuch gestartet, dabei wurde die interne Waage tariert und der Darm erhielt den initialen Bolus von 0,3 ml luminalen Puffers um eine Grundfüllung zu gewährleisten. Die luminale Perfusion wurde zeitgleich gestartet und betrug 4 ml/h bis zum Versuchsende nach 135 Minuten.

2.6.2.1. Besondere Herausforderungen bei der Maus-Präparation

Die im Abschnitt 2.6.2 beschriebenen Präparationsschritte konnten ab der Eröffnung des Bauchfells in der Maus aufgrund der kleinen Gefäßstrukturen nur noch unter einem Operationsmikroskop erfolgen (Abbildung 7). Teilweise waren die zu ligierenden Gefäße sehr fein und kurz, so dass beidseitige Ligaturen mit Seidenfäden nicht in Frage kamen. Der Einsatz von sehr feinen Koagulationspinzetten und Titan-Gefäßclips war hier notwendig, um den Blutverlust und die Leckagen während der Präparation zu minimieren. Eine besondere Schwierigkeit stellte die Kanülierung der Aorta und der *Vena portae* dar (Abbildung 8). Sowohl bei der Aorten- als auch bei der Venenpräparation kam es aufgrund der geringen Größe des Operationsfeldes zu Schwierigkeiten bei der Manipulation und Einführung der Kanülen. Für diesen Zweck wurden optimale Länge, Durchmesser und Winkel der Kanüle ermittelt und diese speziell angefertigt (Abbildung 11). Sowohl die arterielle Kanüle als auch die venöse Kanüle erhielten eine Biegung (110°), um die horizontale und vertikale Mobilität bei geringem Platzangebot zu erhöhen. Die Länge der arteriellen und venösen Kanüle vor der Biegung betrug 5 mm und der Außendurchmesser 1,2 mm (venös) bzw. 1 mm (arteriell). Die Aorta bot bei einer optimalen Präparation nur ca. 5-6 mm Raum, um diese einzuschneiden, die Kanüle einzuführen und zu fixieren. Das Einreißen der Aorta konnte durch einen präzisen Schnitt auf der Oberseite der Aorta verhindert werden. Hierzu wurde die Vorderwand der Aorta mit Hilfe einer Pinzette hochgehalten und ein 1-2 mm langer Schnitt quer zum Gefäß gesetzt. Die Kanülierung der Vene erwies sich ebenfalls als schwierig, da das Gefäß sehr fragil ist und durch die vaskuläre Perfusion transparent wurde. Nach der Eröffnung der Vene musste die Kanülierung umgehend erfolgen, da eine Relokalisation der Öffnung oftmals schwierig war. Die luminale Kanülierung des Maudünndarms stellte keine besondere Herausforderung dar, allerdings war bei der Spülung des Lumens eine vorsichtige Erhöhung

der Spülgeschwindigkeit notwendig, da es durch die Kompression der Nahrungsreste im Darm zu einem Verschluss kommen konnte. Ein leichtes „Ausrollen“ der verstopften Segmente mit feuchten Wattestäbchen konnte in Kombination mit einer leicht pulsierenden Spülung das Lumen reinigen. Bei der luminalen Spülung blieb der gemessene intraluminale Druck unterhalb von 10 mmHg. Der Außendurchmesser der luminalen Kanülen wurde auf den Maudünndarm angepasst und auf der oralen und aboralen Seite auf 2,5 mm verkleinert. Neben der Kanülierung war der Transfer des isolierten Maudünndarms nach der Präparation in die Kammer eine große Herausforderung. Oftmals zeigten die isolierten Dünndärme in der Perfusionskammer eine vaskuläre Undichtigkeit, welche oftmals auf einen Transportschaden zurückzuführen war. Hierbei kam es beim Transport zu kleinen Verschiebungen der Kanülen zueinander und zur Lage des Präparats. Die auftretenden Spannungen erzeugten kleine Leckagen im vaskulären Gefäßsystem, die sich erst im weiteren Perfusionsverlauf zeigten. Mit einer speziell entwickelten Transportvorrichtung konnte der isolierte Darm mit geringerem Aufwand auf einer Unterlage mit dem Kanülierungsblock über ein Kugelgelenk mit Schraube fixiert (Abbildung 11) werden. Dadurch wurde der isolierte Dünndarm gegenüber den Kanülen immobilisiert und mit geringerem Risiko in die Perfusionskammer (Abbildung 10) transferiert.



Abbildung 7: Übersicht nach Entfernung des Dickdarms und Pankreas.
A Narkosemaske, B Maudünndarm mit assoziierten Gefäßen.

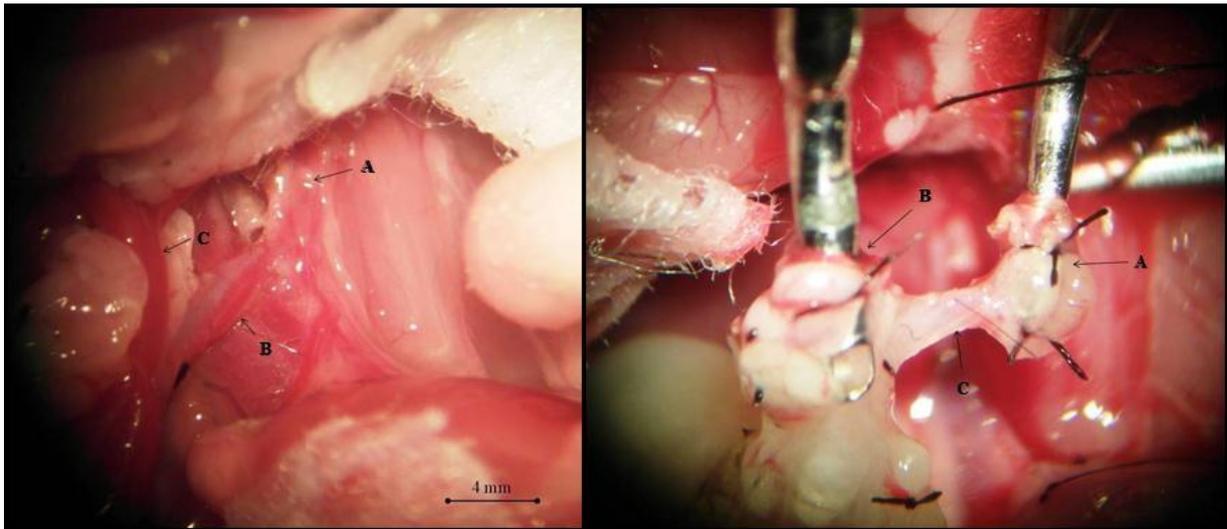


Abbildung 8: Präparation der Aorta und *Vena portae*.

Links: Gefäße vor der Kanülierung bei 6-facher Vergrößerung, A Aorta (verdeckt), B *Arteria mesenterica*, C *Vena portae*. Rechts: Gefäße nach der Kanülierung bei 6-facher Vergrößerung, A arterielle Kanüle, B venöse Kanüle, C *Arteria mesenterica*.

2.6.3. Perfusionsanlage

Für das isoliert perfundierte Maudünndarm-Modell wurde eine speziell modifizierte Anlage benötigt, die auf einem für den isoliert perfundierten Rattendünndarm entwickelten System von HSE (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) basierte. Diese Sonderanfertigung wurde, wie auch die gesamte Perfusionsanlage, in Zusammenarbeit mit HSE geplant und hergestellt. Die Anlage (Abbildung 9) bestand aus einem Grundgehäuse (Plugsysgehäuse), welches in modularer Bauweise aus mehreren Einheiten zusammengesetzt war. Neben einer Kontrolleinheit (*Servocontroller for Perfusion*) zur Einstellung der Perfusionsrate, einem Verstärker (*DC Bridge Amplifier Typ 600*) zur Gewichtsbestimmung in der Kammer, drei Verstärkern (*Transducer Amplifier Modulen TAM A*) für die Druckmessung in den unterschiedlichen Kompartimenten über die Druckaufnehmer (*Arterial Pressure Transducer APT 300*) fanden noch weitere drei Module (*TAM D Module*) für die Steuerung der verschiedenen Waagen (*Weight Sensor*) zur Gewichtsbestimmung im Gehäuse Platz. Die analogen Daten der Module wurden via Kabel an einen Analog-Digital Wandler (*HSE-USB Data Acquisition Hardware*) weiter geleitet und für den Computer umgewandelt. Die Software (*Basic Data Acquisition Software (BDAS)*) konnte die gemessenen Parameter als Zahlenwerte und Diagramme auf dem Monitor darstellen. Der vaskuläre Puffer wurde zunächst durch einen vom Wasserbad beheizten Dialysator (Fxpæd, Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland) geleitet, der mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) gesättigt war. Hierdurch wurde das Perfusat oxygeniert um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des

Organs zu gewährleisten. Eine Schlauchpumpe (Reglo Analog, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) transportierte den oxygenierten Puffer mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min durch den Kanülierungsblock, der durch ein Wasserbad (Thermostatic Circulator E103, Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland) auf 36,9 °C erwärmt wurde. Dieser führte in die Perfusionskammer, welche ebenfalls auf 36,9 °C temperiert war. Der Puffer wurde über die arterielle Kanüle in die Aorta des isolierten Dünndarms geleitet und verließ nach Durchlaufen des Gefäßsystems den Darm über die venöse Kanüle, die an der *Vena portae* angebunden war. Der isoliert perfundierte Maudünndarm lag hierbei in einer Schale mit integrierter Waage, die mit einer Absaugvorrichtung verbunden war. Dieses in die Kammer abfließende Perfusat wurde als lymphatische Fraktion über eine Schlauchpumpe auf einer Waage gesammelt. Die über die venöse Kanüle abfließende Fraktion wurde ebenfalls auf eine Waage transportiert. Das Lumen des Darms wurde an der oralen und aboralen Kanüle (luminal) fixiert. Der luminal Puffer wurde über eine Spritzenpumpe (PHD 2000, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 4 ml/h über den Kanülierungsblock und der oralen luminalen Kanüle in den Darm geleitet. Das über die aborale Kanüle abfließende Perfusat wurde als luminal Fraktion auf einer Waage aufgenommen. An den arteriellen, venösen und luminalen Kanülen waren jeweils Druckaufnehmer angeschlossen, die zusammen mit den angeschlossenen Waagen eine Onlineüberwachung dieser Parameter ermöglichte.

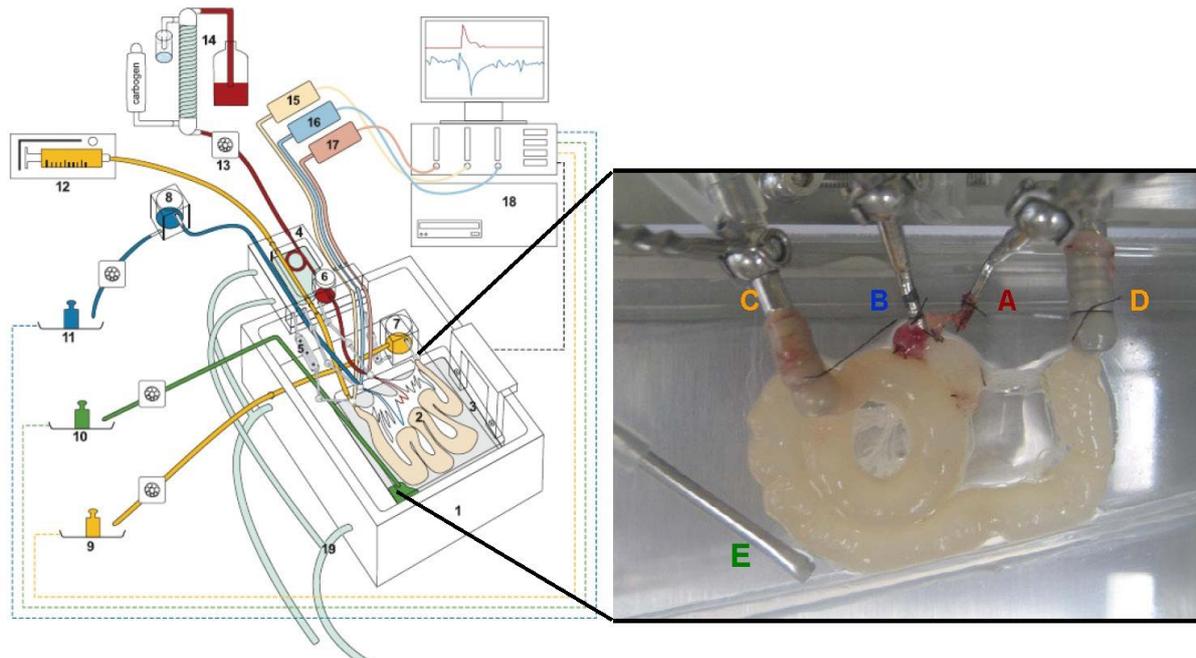


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Perfusionskammer und Darstellung des isoliert perfundierten Maudünndarms.

1. Perfusionskammer, 2. Dünndarm, 3. integrierte Waage, 4. Perfusionsblock, 5. Kanülenhalter, 6. Blasenfalle, 7-8. Reservoir, 9-11. Waagen, 12. lumenale Spritzenpumpe, 13. Rollerpumpe, 14. Carbogengas, 15-17. Druckaufnehmer, 18. PC, 19. Wasserbad, A arterielle Kanüle, B venöse Kanüle, C lumenale Kanüle (oral), D lumenale Kanüle (aboral), E lymphatische Absaugung (modifiziert nach [29]).

2.6.3.1. Notwendige Modifikationen an der Perfusionsanlage

Für den isoliert perfundierten Maudünndarm mussten Teile der etablierten Rattenanlage modifiziert oder komplett neu konstruiert werden. Eine Übersicht der modifizierten Kammer wird in Abbildung 10 gezeigt. Neben den in 2.6.2.1 genannten Veränderungen an den Kanülen und der Transportvorrichtung wurden weitere Modifikationen notwendig, um die deutlich geringeren Effluatmengen der verschiedenen Kompartimente quantifizieren zu können. Die Auflage des isolierten Dünndarms wurde neu konstruiert und diente sowohl als verkleinertes Sammelgefäß des lymphatischen Effluats als auch als Unterlage der Transportvorrichtung (Abbildung 11). Eine Verkleinerung des lymphatischen Sammelgefäßes kann bei den geringeren Effluatmengen die Verweildauer des Effluats auf der Unterlage verringern und somit schneller abgesaugt und auf der Waage quantifiziert werden. Durch die geringen Perfusionsraten von 2 ml/min (vaskulär) und 0,06 ml/min (luminal) wurden zur Quantifizierung der Effluats Waagen mit höherer Auflösung benötigt. Diese Waagen wurden von HSE speziell für die Mausperfusionsanlage angefertigt. Sie bestanden aus einem analogen Gewichtsmesser, der mit einem Steuermodul zur Signaltransformation verbunden wurde (Abbildung 11). Über einen mit dem Steuermodul verbundenen Computer konnten die Gewichtsdaten der Effluats mit der BDAS Software in Echtzeit dargestellt werden.

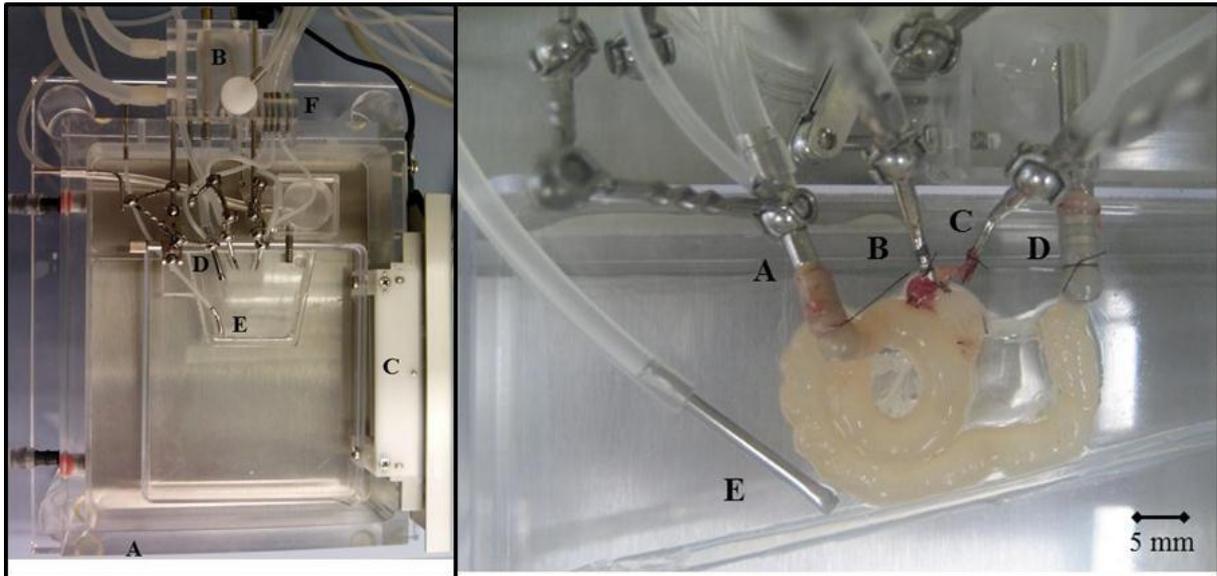


Abbildung 10: Perfusionsskammer und der isolierte Mäusdünndarm in der Kammer.

Links: Übersicht der modifizierten Perfusionsskammer, A Perfusionsskammer ohne Deckel, B Kanülierungsblock mit Blasenfalle und Heizspirale, C integrierte Waage, D Anordnung der Kanülen, E Transportunterlage und lymphatische Absaugung, F Schläuche der Druckaufnehmer. Rechts: Nahaufnahme eines isolierten Dünndarms mit modifizierten Kanülen auf der Waagschale, A luminale Kanüle (oral), B venöse Kanüle, C arterielle Kanüle, D luminale Kanüle (aboral), E lymphatische Absaugung (1. Version der lymphatischen Absaugung ohne Transportunterlage).

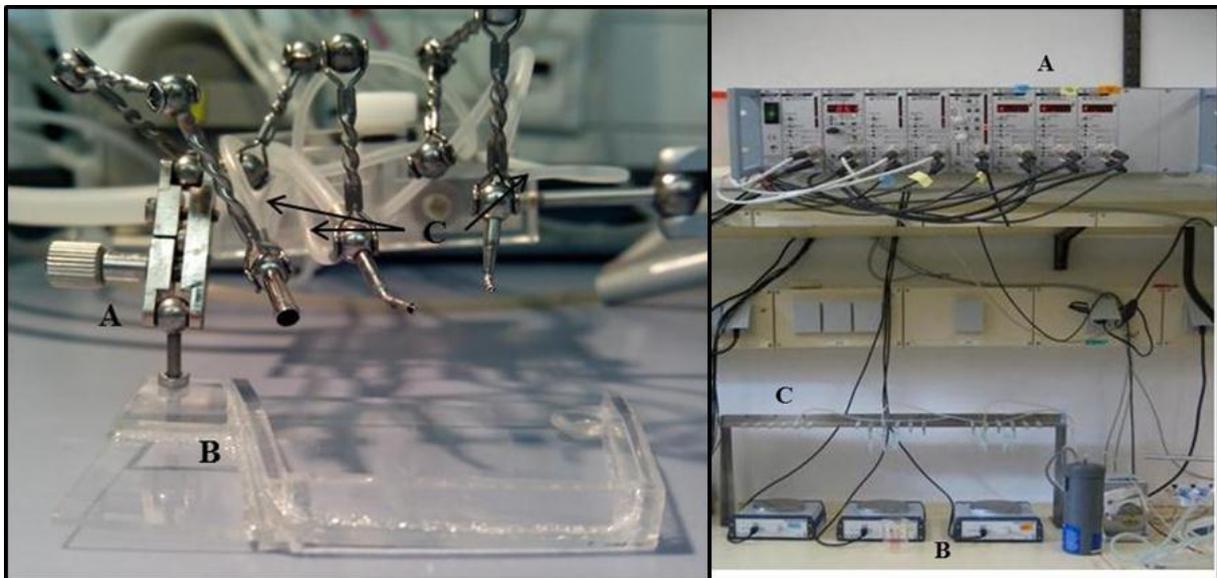


Abbildung 11: Kanülen mit Transporthalterung und die Steuermodule mit Gewichtsmessern.

Links: Nahaufnahme der Transporthalterung (finale Version), A Trennbares Kugelgelenk mit Schraube, B Transportunterlage mit integrierter verkleinerter Sammelvorrichtung (Lymphe), C Pfeile zeigen auf Schläuche der Seitenabgänge der Kanülen (Druckbestimmung). Rechts: Modifizierte Gewichtsmesser mit Steuermodulen, A Zentrale Steuermodule der Perfusionsanlage, B Gewichtsmesser für vaskuläres, lumenales und lymphatisches Effluat, C Stativ und Haltevorrichtung zur fraktionierten Probenentnahme.

2.6.4. Etablierung der vaskulären Perfusionslösung

Die Zusammensetzung des Puffers in der Kontroll- und PAF-Gruppe wurde vom isoliert perfundierten Rattendünndarm-Modell unverändert übernommen (2.1.1.), da in Vorversuchen mit einem an die Mausphysiologie angepassten vaskulären Perfusat mit erhöhter Ca^{2+} , Glukose- und BSA-Konzentration keine Vorteile bezüglich der Galaktoseaufnahme, Histoscore und Feucht- zu Trockengewicht nach der Perfusion ersichtlich waren (Daten nicht gezeigt).

2.6.5. Etablierung der Perfusionsparameter

Als erste Richtwerte für die vaskuläre Perfusionsrate des Maudünndarms wurden Angaben aus der Literatur entnommen [42-46]. Die dort ermittelten vaskulären Flussraten für den Dünndarm und Gastrointestinaltrakt lagen zwischen $0,8\text{-}2,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Organgewicht), umgerechnet auf das Gewicht des isolierten Maudünndarms läge die Perfusionsrate bei 2,5-3 ml/min. Ein weiterer Richtwert war der durch die Perfusion erzeugte mittlere arterielle Druck (MAP), der sich an den MAP im isoliert perfundierten Rattenmodell orientierte. Bei 35 bis 45 mmHg konnten im isolierten Rattendünndarm-Modell stabile Versuchsbedingungen mit intakter Morphologie und Funktion gezeigt werden [29]. Dieser arterielle Druck lag deutlich unterhalb des physiologischen MAP (90-140 mmHg) in Wildtyp-Mäusen [47, 48]. Vergleiche mit anderen Studien mit isolierten Organsystemen zeigten, dass die Perfusionsdrücke der isolierten Organe immer deutlich unterhalb des systemischen Drucks lagen, aus denen die Organe entnommen wurden [29, 49]. Aufgrund der Abweichung in Viskosität und des Fehlens der korpuskulären Anteile im vaskulären Puffer im Vergleich zum Vollblut, sollte bei der vaskulären Perfusion mit BSA-haltigem Puffer ein zu hoher Perfusionsdruck vermieden werden. Der geringere Anteil an kolloidosmotisch wirksamen Teilchen im vaskulären Perfusat kann bei hohem intraarteriellem Druck (Filtrationsdruck) die Rückresorption von Flüssigkeit aus dem Interstitium ins vaskuläre Kompartiment nicht gewährleisten, was zu einer vermehrten Flüssigkeitsextravasation ins Interstitium und somit zur Ödembildung führen kann (siehe 1.2). Der erzeugte intraarterielle Perfusionsdruck bei unterschiedlichen Perfusionsraten wird in Abbildung 12 dargestellt. Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, dass mit einer vaskulären Perfusionsrate von 2 ml/min ein MAP von 40-45 mmHg und eine stabile luminale Galaktoseaufnahme des isolierten Dünndarms erreicht werden kann. Die Daten weisen auf einen starken Abfall der luminalen Galaktoseaufnahme bei Perfusionsraten von 1-1,5 ml/min hin, was auf einen möglichen Funktionsverlust des Dünndarms hindeuten

könnte (siehe Abbildung 12). Eine Erhöhung der Perfusionsrate auf 2 ml/min konnte die luminal Galaktoseaufnahme stabilisieren und ähnliche Werte wie im isolierten Rattendünndarm-Modell zeigen. Die anderen untersuchten Parameter wie Histomorphologie, Laktat zu Pyruvat Verhältnis, Sauerstoffaufnahme, und Barrierefunktion zeigten in den Vorversuchen keine signifikante Abhängigkeit zu den untersuchten Perfusionsraten (Daten nicht gezeigt).

Die luminal Perfusionsrate wurde nach Vorversuchen auf 0,06 ml/min eingestellt, da diese Perfusionsrate ausreichende Probenvolumina generierte und ein Verschleimen und Verstopfen des Lumens vermeiden konnte. Laut Literatur wurden luminal Perfusionsraten von 0,13-1 ml/min für Untersuchungen genutzt [26, 43, 44].

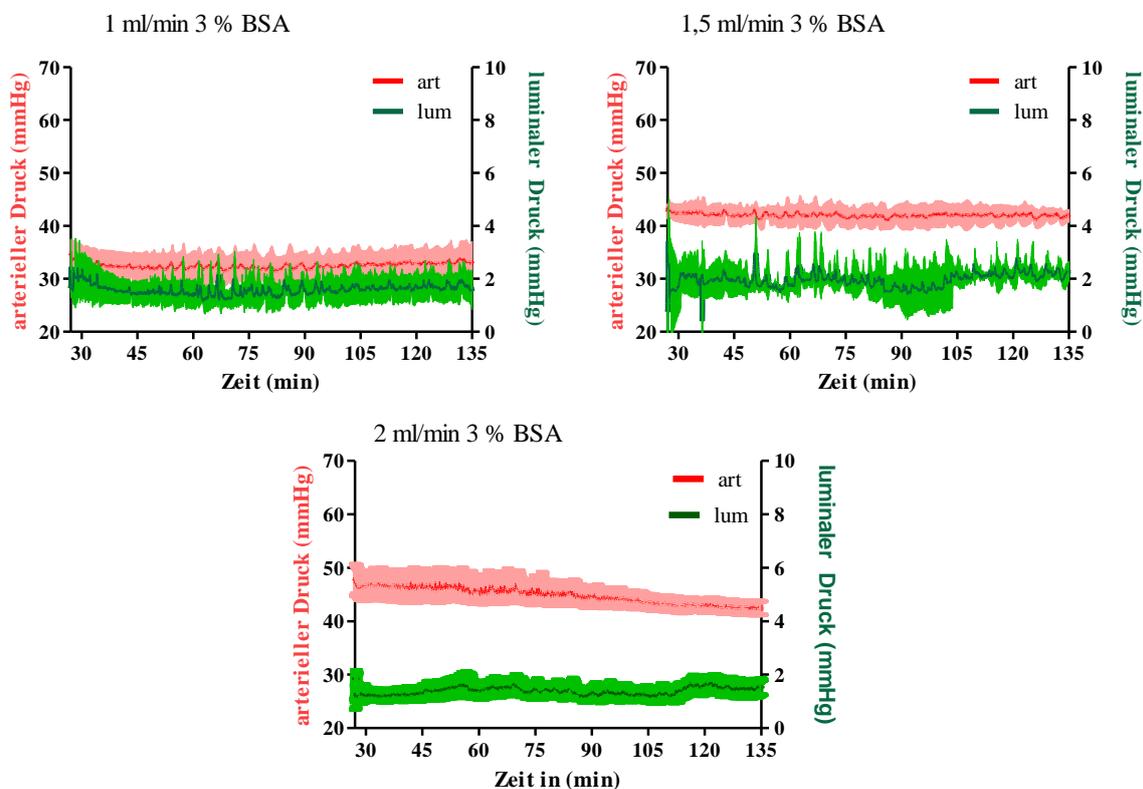


Abbildung 12: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck bei verschiedenen Perfusionsraten. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. Die luminal Perfusion betrug in allen Gruppen 0,06 ml/min. Mittelwerte wurden aus n=4 gebildet mit Ausnahme bei 2 ml/min mit n=7.

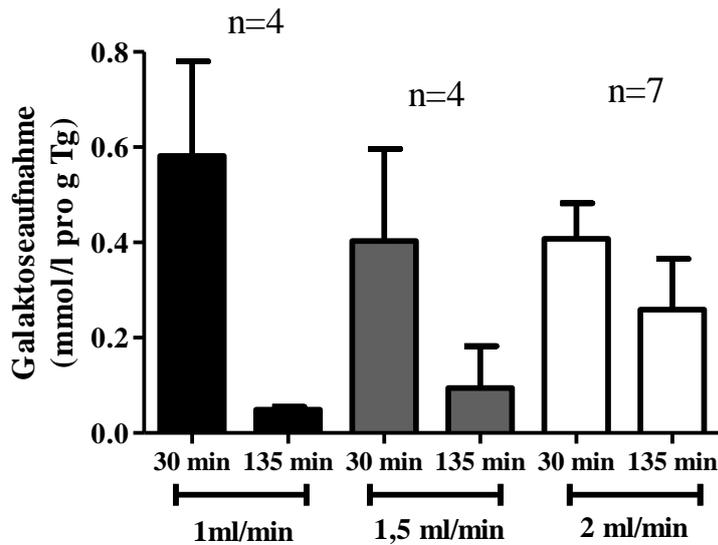


Abbildung 13: Luminale Galaktoseaufnahme des Darms bei verschiedenen Perfusionsraten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung, Tg Trockengewicht.

2.6.6. Modifikation bei Probenentnahme und Messmethoden

Aufgrund der niedrigen vaskulären und luminalen Perfusionsraten im Maudünndarm-Modell mussten die Intervalle der Probenentnahmen, die gesammelten Probenmengen und ihre Analysemethoden etabliert werden. Die im Rattenmodell vorgegebenen Intervalle zur Probenentnahme konnten bis auf die lymphatischen Effluat übernommen werden. Die geringen lymphatischen Volumina die im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell gesammelt werden können (1-2 ml/h), entsprechen in etwa der physiologisch *in vivo* gebildeten Lymphmenge (siehe Diskussion 4.1.2). Ein für die FITC-Dextran-Messung ausreichendes Volumen konnte nur durch 15-minütige Sammelintervalle gesichert werden. Die Analyse der Pyruvat- und Galaktosekonzentrationen war problemlos, sowohl die Probenmenge als auch die darin enthaltenen Konzentrationen waren im Messbereich der verwendeten Methoden.

2.6.7. Zusammenfassung (Etablierung)

Das Maudünndarm-Modell konnte auf Basis des Rattendünndarm-Modells [29] etabliert werden. Die Anpassungen der Kleintiermarkose an die Maus führten zu einer stabileren Narkose mit konstanter Atmung mit ein bis zwei Atemzügen pro Sekunde. Durch den Einsatz eines Operationsmikroskops (Präparation bei sechs- bis zehnfacher Vergrößerung) und anderer technischer Präparationshilfen (Koagulator, Titan Gefäß Clips, modifizierte arterielle, venöse und luminale Kanülen) konnte die Präparationsdauer verkürzt und die vaskuläre

Dichtigkeit der isolierten Därme verbessert werden. Die Anzahl der fehlerhaften Präparationen mit vaskulären "Undichtigkeiten" wurde deutlich reduziert. Besonders die in Kooperation mit Hugo Sachs Elektronik entwickelten Teile zur Kanülierung und zum Transport des Dünndarms führten zu starken Verbesserungen der vaskulären Integrität. Die für den isoliert perfundierten Maudünndarm geeignete vaskuläre Perfusionsrate von 2 ml/min wurde anhand des erzeugten intraarteriellen Druckes (40-45 mmHg) und der über den Versuchsverlauf stabilen Galaktoseaufnahme des isolierten Dünndarms ermittelt. Die luminal Perfusionsrate wurde für das Maudünndarm-Modell auf 0,06 ml/min reduziert. Eine Anpassung der Elektrolyt-Konzentrationen im vaskulären Perfusat an die Spezies Maus brachte keine Verbesserung in der Galaktoseaufnahme, Histoscore oder Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht nach der Perfusion und wurde nicht weiter verfolgt. Durch eine Verlängerung der Probenentnahme-Intervalle konnte auch bei der geringen lymphatischen Flussrate genügend Probenvolumen gesammelt werden, um die notwendigen Analysen durchführen zu können.

2.7. Versuchsablauf und Versuchsschemata der Gruppen

2.7.1. Ablauf der Isolation des Maudünndarms

Alle Dünndärme wurden nach einem Präparationsschema isoliert, die Gesamtdauer der Präparation variierte dabei um ± 20 Minuten. Der genaue Ablauf ist in Abbildung 14 näher erläutert.

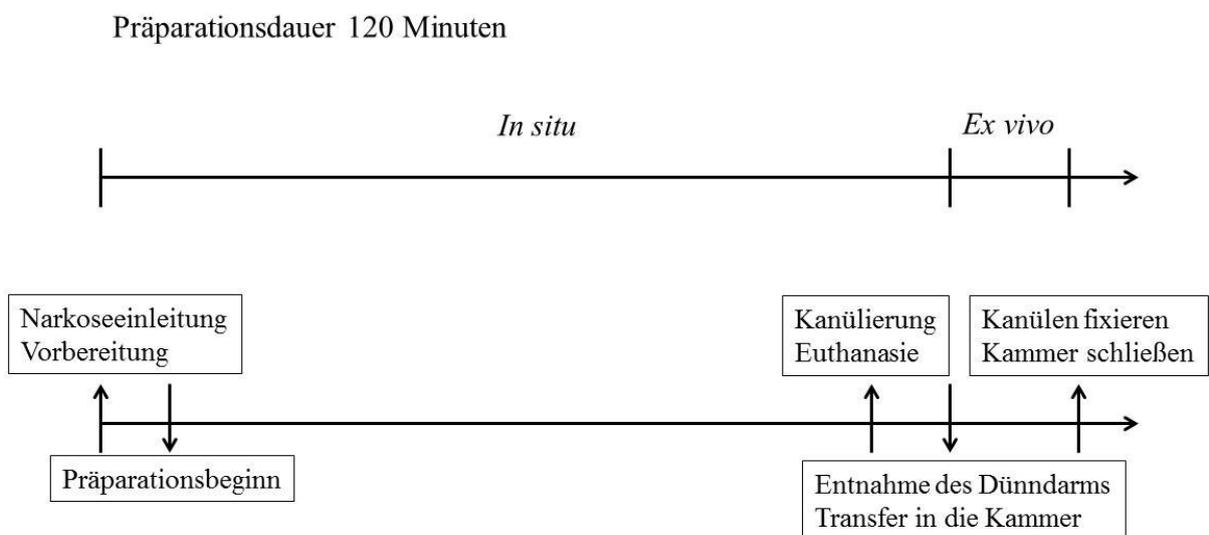


Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf von Narkoseeinleitung bis zum Versuchsbeginn.

2.7.2. Versuchsschema Validierung

2.7.2.1. Kontrollbedingungen

Bei allen Versuchen erhielt der Darm nach einer 27 minütigen Equilibrationsphase initial einen luminalen Bolus von 0,3 ml luminalem Puffer. Der isolierte Darm wurde vaskulär von Beginn an mit 2 ml/min und luminal ab Minute 27 mit 4 ml/h perfundiert. Zur Überprüfung des O₂- und CO₂ Partialdruckes, des pH-Werts, Laktat-, Glukose- und Elektrolyte Konzentrationen im vaskulären und luminalen Perfusat wurde ein Blutgasanalysator (ABL700, Radiometer Copenhagen, Brønshøj, Dänemark) eingesetzt. Hierzu wurden in 15 minütigen Abständen arterielle Proben kurz vor dem Einleiten in das Organ (arteriell) und nach dem Durchlaufen des isolierten Dünndarms (venös) entnommen. Für die arterielle Blutgasanalyse (BGA) wurden 2 ml Probe abgenommen, von denen 150 µl für die Messung benötigt wurden. Venös wurden ebenfalls 2 ml entnommen, wobei jeweils 750 µl auf die Pyruvat- und Galaktose Messung und 100 µl für die FITC-Dextran-Bestimmung entfielen. Der Probenrest wurde für die BGA verwendet.

Um die abfließenden Perfusate zeitlich fraktioniert aufzunehmen, wurde bei der luminalen und lymphatischen Probenahme alle 15 Minuten das Probegefäß gewechselt. In der Kontrollgruppe kam es zu keinen Interventionen innerhalb der Perfusionsdauer von 135 Minuten (Abbildung 15).

Kontrollgruppe (n=7)

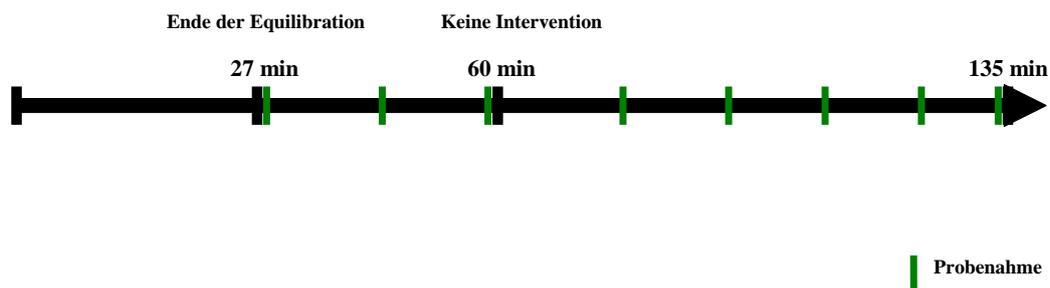


Abbildung 15: Schematischer Ablauf in der Kontrollgruppe.

Zwischen Minute 60 und 75 wurden lymphatisch und luminal alle drei Minuten die Probengefäße gewechselt (in Abbildung nicht gezeigt), Zeitpunkte der venösen Probeentnahme alle 15 Minuten in grün dargestellt.

2.7.2.2. PAF Stimulation

Der Ablauf war bis zu Minute 60 identisch mit der Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt erhielt der Darm einen vaskulären Bolus mit 12,5 pmol PAF, gelöst in 50 µl vaskulärem

Puffer. Die Zeiten für die arterielle, venöse, lumbale und lymphatische Probenahme waren identisch zur Kontrollgruppe.

PAF-Gruppe (n=4)

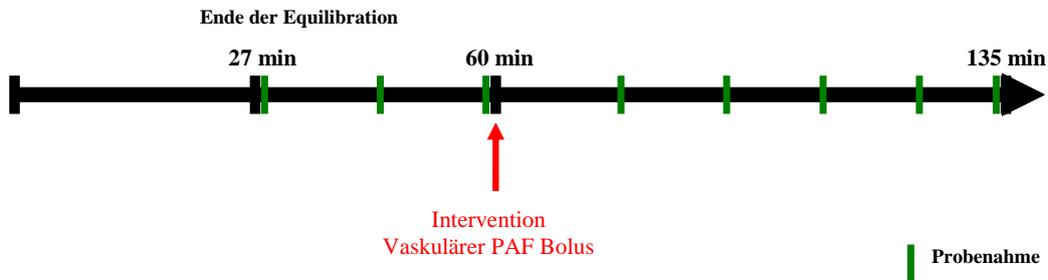


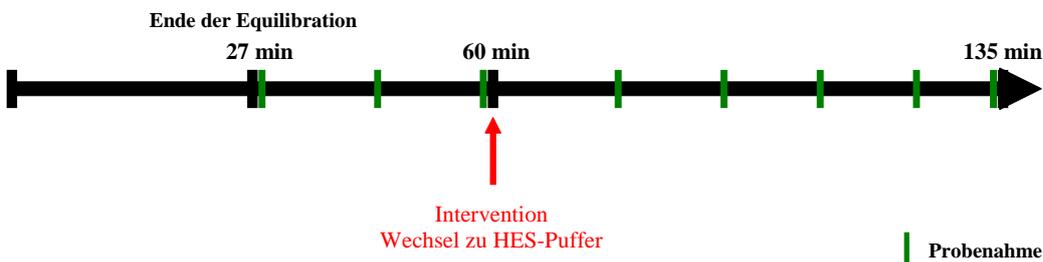
Abbildung 16: Schematischer Ablauf in der PAF-Gruppe.

Zwischen Minute 60 und 75 wurden lymphatisch und luminal alle drei Minuten die Probengefäße gewechselt (in Abbildung nicht gezeigt), Zeitpunkte der venösen Probeentnahme alle 15 Minuten in grün dargestellt.

2.7.3. Versuchsschema Untersuchungen in HES-Gruppen

2.7.3.1. 3 % HES 130/0,4 und HES 200/0,5 (Krebs-Henseleit-Puffer)

In den HES-Gruppen 130/0,4 und 200/0,5 wurde bis 60 Minuten mit dem BSA-haltigen Puffer perfundiert um eine Equilibrierung zu erreichen und anschließend auf den jeweiligen HES-Puffer 3 % (Zusammensetzung 2.1.2-2.1.3) gewechselt. Die Intervalle der Probenahme waren identisch mit der Kontrollgruppe.



HES-Gruppe
130/0,4 HES 3 % (n=4)
200/0,5 HES 3 % (n=4)

Abbildung 17: Schematischer Ablauf in den HES-Gruppen 130/0,4 und 200/0,5.

Zwischen Minute 60 und 75 wurden lymphatisch und luminal alle drei Minuten die Probengefäße gewechselt (in Abbildung nicht gezeigt), Zeitpunkte der venösen Probeentnahme alle 15 Minuten in grün dargestellt.

2.7.3.2. 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium)

Der Ablauf in der 4 % HES 200/0,5-Gruppe war identisch zur Kontrollgruppe. Das vaskuläre Perfusat wurde durch eine 4 %ige HES-Lösung ersetzt (Zusammensetzung 2.1.4) und damit von Beginn an perfundiert.

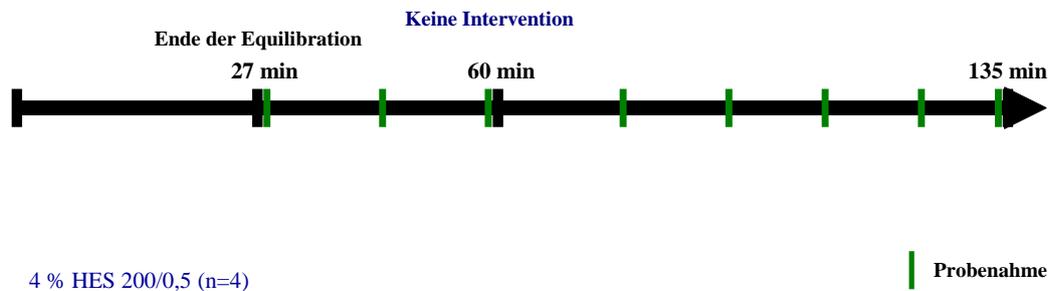


Abbildung 18: Schematischer Ablauf in der 4 % HES 200/0,5 Gruppe.

Zwischen Minute 60 und 75 wurden lymphatisch und luminal alle drei Minuten die Probengefäße gewechselt (in Abbildung nicht gezeigt), Zeitpunkte der venösen Probeentnahme alle 15 Minuten in grün dargestellt.

2.7.4. Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Kalifornien, USA) genutzt. Die Berechnungen zu Mittelwert und Standardabweichung wurden entweder mit MS Excel oder GraphPad Prism durchgeführt. Alle Tabellen wurden mit MS Excel und die weiteren Grafiken mit GraphPad Prism erstellt. Zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov Test eingesetzt. Das Signifikanzlevel wurde mit Graphpad Prism berechnet. Hierzu wurde je nach vorliegendem Vergleich der abhängige oder unabhängige t-Test als auch der one bzw. two tailed t-Test (zweiseitig) genutzt. Bei nicht parametrischen Daten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt. Um Vergleiche mehrerer Zeitpunkte innerhalb einer Versuchsgruppe durchzuführen, wurde die einfaktorielle ANOVA (mit Bonferroni Post-Test) eingesetzt. Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen (Kontrollbedingungen vs. PAF/HES) wurden mit der zweifaktoriellen Anova (Bonferroni Post-Test) untersucht. Daten, die nicht normalverteilt waren, wurden vor der statistischen Analyse transformiert. Bei der Galaktoseaufnahme wurden die Daten zunächst über folgende Formel $Y = \text{Log}(Y)$ transformiert und anschließend über die zweifaktorielle Anova (Bonferroni Post-Test) ausgewertet.

Zur Berechnung der Flussrate wurde in allen Versuchsgruppen die erste Ableitung aus den Gewichtsdaten der Effluat gebildet und durch eine gleitende Mittelwertbildung über 45 Nachbarwerte geglättet.

2.7.5. Software

Die gezeigten Abbildungen wurden mit GraphPad Prism 5.01 und dem Microsoft Office Paket 2010 erstellt. Für einige Abbildungen wurden Elemente der Powerpoint image bank von Servier Medical Art genutzt.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells

Wie im Abschnitt 2.6 beschrieben, konnte das isoliert perfundierte Maudünndarm-Modell erfolgreich etabliert werden. Im Vergleich zum Ratten-Modell [29] wurden Modifikationen bei der Narkose, Präparation, Kanülen, Transfer des Darms und Perfusionsparameter durchgeführt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Modifikationen des Maus-Modells im Vergleich zum Ratten-Modell.

	Maus-Modell	Ratten-Modell [38]
Narkose stabil über	2-3 h	1-2 h
Präparationsdauer	90-120 min	ca. 60 min
Kanüledurchmesser	arteriell 1 mm, venös 1,2 mm	> 1,5 mm
Transportvorrichtung	ja	nein
Auflösung der Waagen	bis 0,01 g	bis 0,1 g
Perfusionsrate vaskulär	2 ml/min	7,5 ml/min
Perfusionsrate luminal	0,06 ml/min	0,15 ml/min
Intervall der Probenentnahme	15 min	bis zu 3 min

3.2. Validierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells

3.2.1. Kontrollbedingungen

Um die Einsatzmöglichkeiten und Stabilität des neuen Modells zu ermitteln, wurde der isoliert perfundierte Maudünndarm unter Kontrollbedingungen untersucht. Dies bedeutet, dass der isolierte Maudünndarm nach der Kanülierung vaskulär konstant mit 2 ml/min und luminal mit 0,06 ml/min perfundiert wurde. Das vaskuläre Perfusat bestand aus einer 3 %igen BSA-Lösung (Zusammensetzung siehe 2.1.1) und der eingesetzte luminaire Puffer (2.2) war in allen folgenden Versuchsreihen identisch. In der Kontrollgruppe wurden die isolierten Maudünndärme 135 Minuten lang perfundiert und zu keinem Zeitpunkt Interventionen durchgeführt.

3.2.1.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck

Während der Versuchsdauer wurde von den Druckaufnehmern kontinuierlich der intraarterielle, intraluminale und intravenöse Druck gemessen und mit der BDAS Software in Echtzeit dargestellt und aufgezeichnet. Diese Druckdaten sind ein Ausschlusskriterium in der Bewertung der Validität eines Versuchs, da Präparationen mit Leckagen oder Abweichungen von den Kontrollbedingungen sofort sichtbar werden. Der venöse Druck wurde in die Auswertung nicht aufgenommen, da dieser manuell über einen Nachlastbehälter auf einen Druck von 0-1 mmHg eingestellt wurde.

Die Druckdaten aus der Kontrollgruppe zeigten einen stabilen arteriellen Druck zwischen 43-50 mmHg über den Versuchszeitraum (Abbildung 19). Mit zunehmender Versuchsdauer nahm der arterielle Druck leicht ab. Der luminaler Druck blieb bis auf wenige kontraktionsbedingte Spitzen stabil bei 1-2 mmHg.

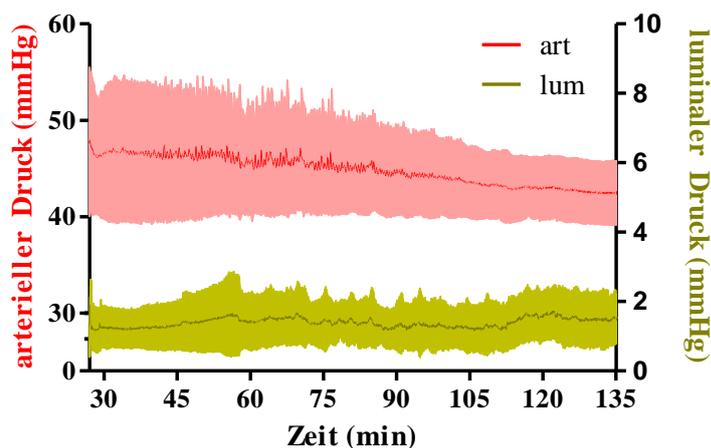


Abbildung 19: Mittlerer intraarterieller und intraluminale Druck.

Der arterielle (rot, linke Y-Achse) und luminaler Druck (gelb, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung im Zeitraum 27 bis 135 Minuten (n=7).

3.2.1.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss

Anhand der berechneten Flussraten konnten Rückschlüsse auf die Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb der verschiedenen Kompartimente gezogen werden.

Sowohl die venösen als auch die luminalen Flussraten blieben über den Versuchsverlauf konstant und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 20). Bei der lymphatischen Flussrate kam es zu einer signifikanten Zunahme zum Versuchsende [30-45 min ($0,011 \pm 0,006 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 45-60 min ($0,012 \pm 0,005 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 60-75 min ($0,013 \pm 0,005 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. 120-135 min ($0,025 \pm 0,007 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,01$].

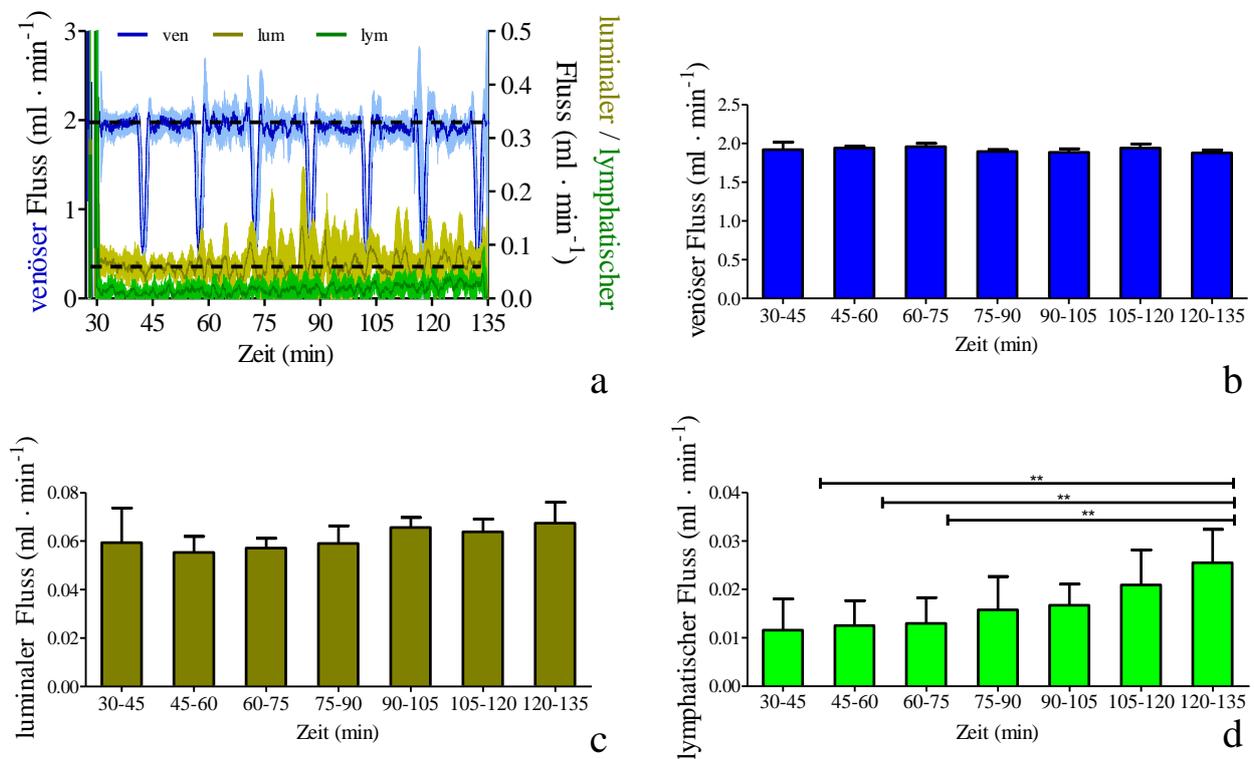


Abbildung 20: Mittlere venöse, luminale und lymphatische Flussraten.

Gezeigt werden in a) die venöse- (blau, linke Y-Achse), luminale (gelb, rechte Y-Achse) und lymphatische Flussrate (grün, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung ($n=7$). Die schwarz gestrichelten Linien markieren die voreingestellte Perfusionsgeschwindigkeit der vaskulären (2 ml/min) und luminalen (0,06 ml/min) Perfusion (Erwartungswerte). Die Flussraten wurden aus den Gewichtsdaten der Effluat berechnet. Die venösen Artefakte in 15-minütigen Abständen wurden durch die Probenentnahmen verursacht und stellen keinen tatsächlichen Abfall der Flussrate dar. In b) wird die mittlere venöse Flussrate, in c) die mittlere luminale Flussrate und in d) die mittlere lymphatische Flussrate mit der Standardabweichung gezeigt; einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); ** = $p < 0,01$.

3.2.1.3. Barrierefunktion

Um Veränderungen in der intestinalen Barrierefunktion nachweisen zu können, wurde die Konzentration des vaskulär applizierten FITC-Dextrans in den verschiedenen Effluaten untersucht. Je nach Grad der Permeabilisierung werden unterschiedliche Konzentrationen von FITC-Dextran im lymphatischen und luminalen Effluat gemessen.

Die FITC-Dextran-Daten zeigen für die venöse und luminal FITC-Dextran-Konzentration einen konstanten Verlauf (Abbildung 21). Die venöse FITC-Dextran-Konzentration blieb über die Versuchsdauer bei den eingestellten 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und luminal konnte bis zum Versuchsende nur sehr wenig FITC-Dextran ($< 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) nachgewiesen werden. Sowohl für die venösen als auch für die luminalen FITC-Dextran-Konzentrationen wurden keine signifikanten Veränderungen im Versuchsverlauf gefunden. Die lymphatische FITC-Dextran-Konzentration stieg dagegen bis Minute 45 auf ca. 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ an und blieb danach konstant, nur der Zeitpunkt 30. Minute war signifikant niedriger gegenüber den anderen Zeitpunkten.

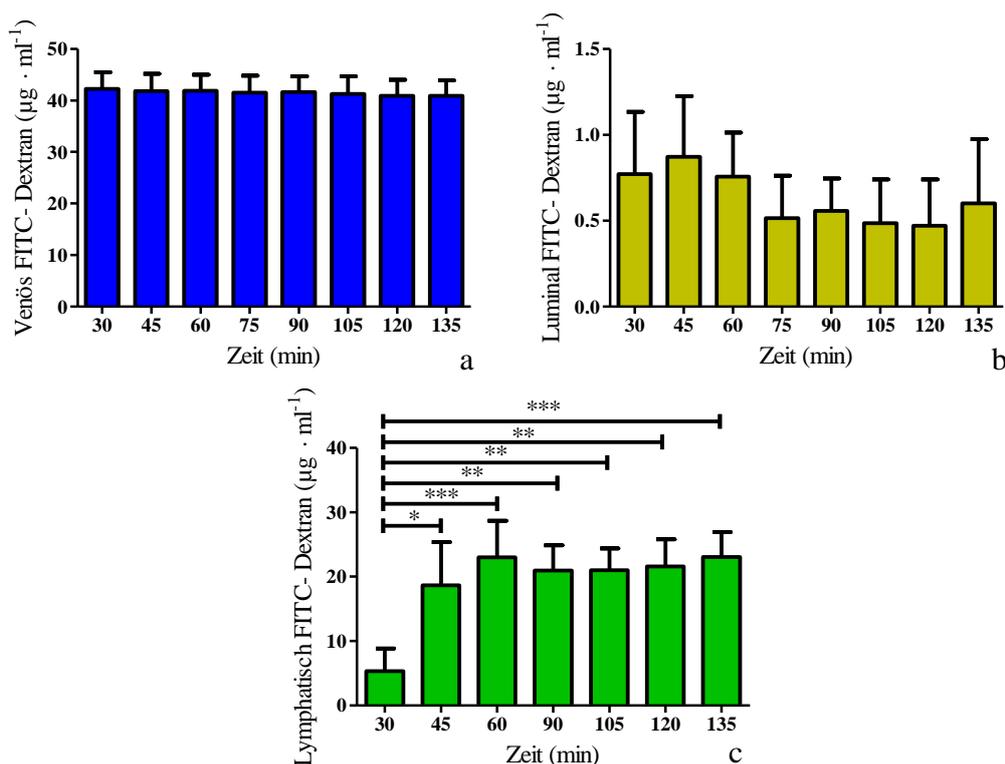


Abbildung 21: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten.

Dargestellt sind die FITC-Dextran-Konzentrationen im venösen (a, blau) luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Kompartiment mit der Standardabweichung ($n=7$); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Um Veränderungen in der Permeabilität registrieren zu können, wurde die in 15 Minuten Intervallen transferierte FITC-Dextran-Menge der verschiedenen Effluat quantifiziert (Abbildung 22). Sowohl beim venösen als auch beim luminalen FITC-Dextran-Transfer blieb die Menge konstant, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten gefunden werden. Beim lymphatischen FITC-Dextran-Transfer konnte eine signifikante Zunahme zum Versuchsende bestimmt werden [60 min ($3,27 \pm 2,87 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($4,09 \pm 1,35 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. 135 min ($8,69 \pm 2,38 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,05$].

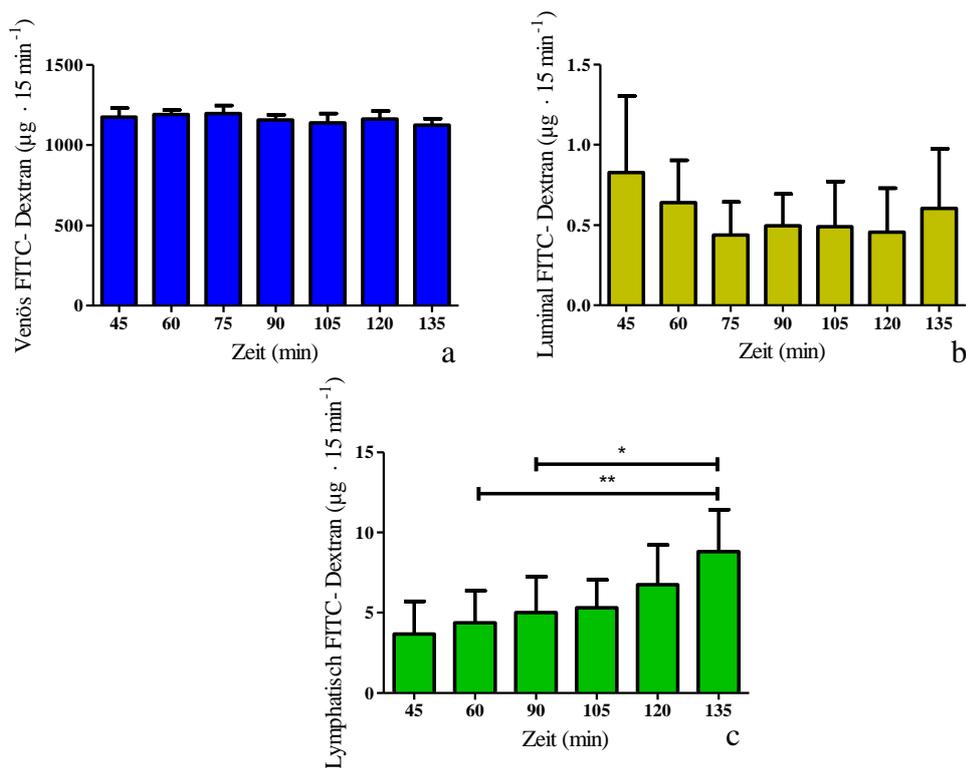


Abbildung 22: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen.

Gezeigt wird der FITC-Dextran-Transfer mit der Standardabweichung im venösen (a, blau), luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Effluat. Dies wurde aus den Gewichtsdaten und FITC-Dextran-Konzentrationen im 15 Minuten Intervall berechnet (n=7); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

3.2.1.4. Gewichtsveränderungen des Darms während der Perfusion

Um mögliche Flüssigkeitseinlagerungen im Dünndarm registrieren zu können, wurde das Gewicht des isolierten Maudünndarms kontinuierlich über eine in die Kammer integrierte Waage bestimmt. Nach einer anfänglichen signifikanten Gewichtszunahme des Dünndarms [30-45 min ($69,59 \pm 78,07$ mg) vs. 90-105 min ($454,9 \pm 206,1$ mg), 105-120 min ($492,4 \pm 207,2$ mg), 120-135 min ($537,3 \pm 246,8$ mg); $p < 0,05$] blieb das Gewicht im weiteren Versuchsverlauf konstant (Abbildung 23).

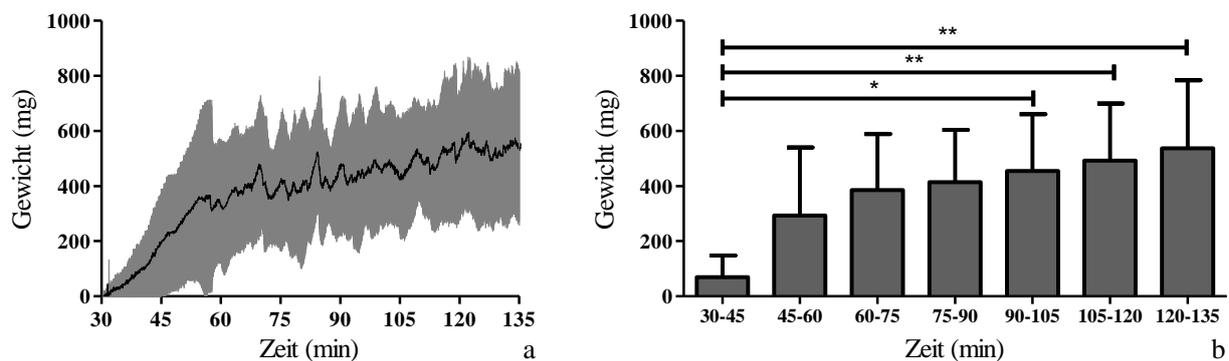


Abbildung 23: Mittlere Gewichtszunahme des Darms.

Dargestellt wird die mittlere Gewichtszunahme des Darms mit der Standardabweichung (a) und die mittlere Gewichtszunahme in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (b) (n=7); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

3.2.1.5. Luminale Galaktoseaufnahme

Um die Funktionsfähigkeit des isoliert perfundierten Maudünndarms zu prüfen, wurde als Parameter exemplarisch die luminale Galaktoseaufnahme bestimmt.

Die Daten zeigten eine stabile Galaktoseaufnahme des Dünndarms zwischen $0,3-0,4 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Trockengewicht Darm mit leicht fallender Tendenz zum Versuchsende. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Galaktoseaufnahme zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 24).

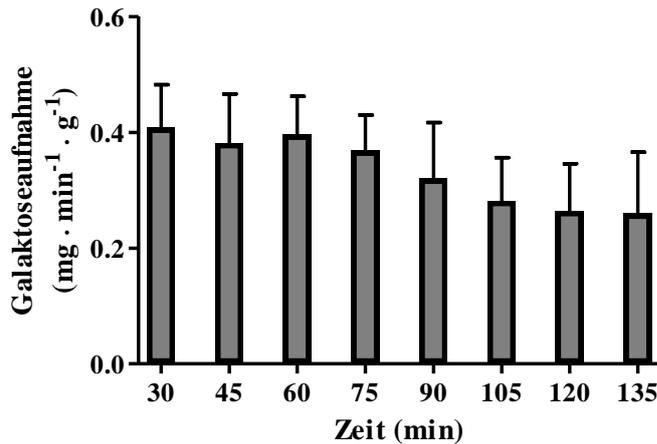


Abbildung 24: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung. Probenentnahme alle 15 Minuten, die Galaktoseaufnahme wurde auf das Trockengewicht normiert (n=6).

3.2.1.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme

Als Parameter zum Nachweis einer ausreichenden Sauerstoffversorgung des Dünndarms wurden die Laktat- und Pyruvat-Konzentrationen bestimmt und ihr Verhältnis berechnet.

Zu Beginn der Perfusion konnten signifikant höhere Laktat zu Pyruvat Quotienten als zum Versuchsende ermittelt werden [30 min ($17,34 \pm 4,94$) vs. 75 min ($11,11 \pm 1,23$), 90 min ($10,09 \pm 1,7$), 105 min ($9,42 \pm 1,42$), 120 min ($8,74 \pm 2,41$), 135 min ($9,11 \pm 2,46$); $p < 0,01$]. Ab Minute 60 war kein signifikanter Abfall im Laktat zu Pyruvat Verhältnis nachweisbar (Abbildung 25).

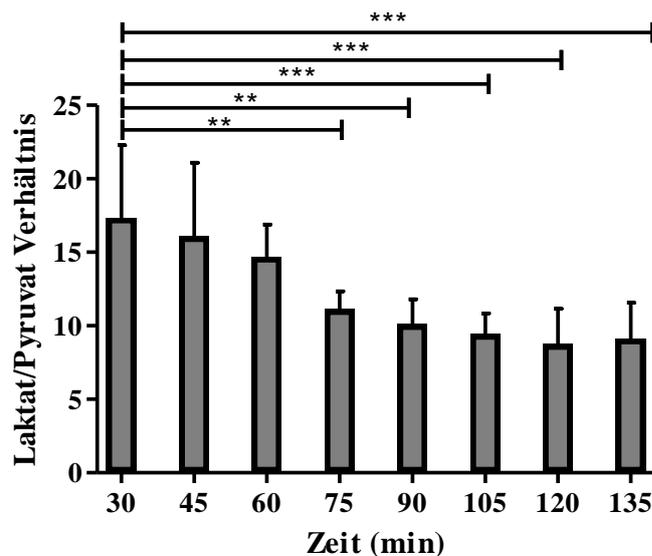


Abbildung 25: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis. Verhältnis berechnet aus venösen Proben in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (n=7); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$.

Um die Stabilität der Perfusionsparameter zu bestimmen, wurde unter anderem der pH-Wert des vaskulären Puffers kontinuierlich überwacht. Es konnte keine statistisch signifikante Veränderung im pH-Wert ermittelt werden (Abbildung 26).

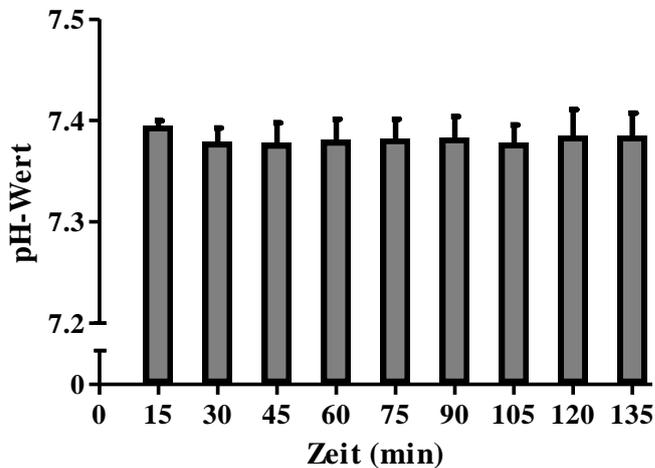


Abbildung 26: Mittlerer arterieller pH-Wert mit der Standardabweichung. (n=7).

Um Veränderungen in der Sauerstoffaufnahme des Dünndarms im Versuchsverlauf untersuchen zu können, wurde der Sauerstoffpartialdruck bestimmt und die Differenz aus der arteriellen und venösen Probe gebildet.

Es konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sauerstoffaufnahme des isoliert perfundierten Maudünndarms im Versuchsverlauf gefunden werden (Abbildung 27).

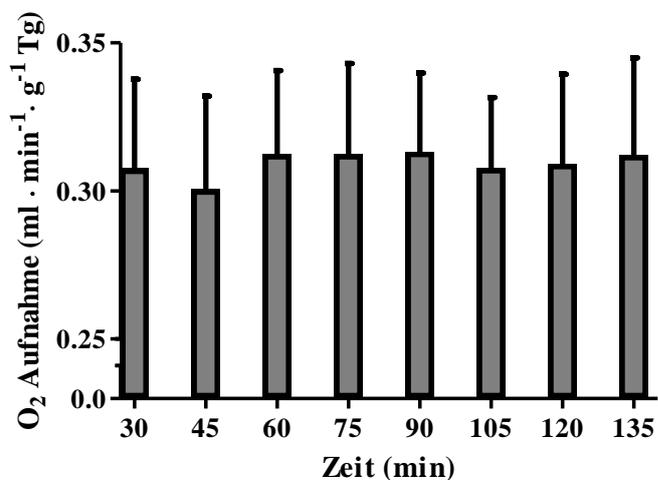


Abbildung 27: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms. Sauerstoffaufnahme normiert auf das Trockengewicht des Darms mit der Standardabweichung (n=6).

3.2.1.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht

Um zusätzliche Flüssigkeitseinlagerungen im Dünndarmgewebe nach der Perfusion ermitteln zu können, wurde das Feucht- zu Trockengewicht des Darms vor und nach der Perfusion bestimmt. Das Feucht- zu Trockengewicht war nach der Perfusion signifikant höher als vor der Perfusion (W/d 2 $5,43 \pm 0,19$ vs. W/d 1 $4,37 \pm 0,19$; $p < 0,001$) (Abbildung 28).

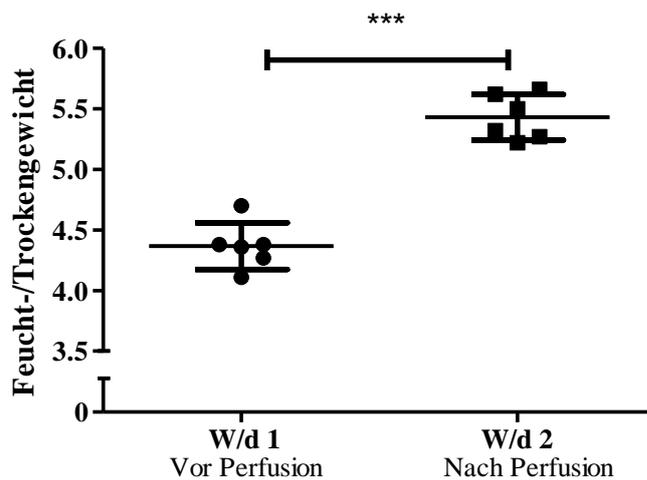


Abbildung 28: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms. Gezeigt werden die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=6); t-Test; *** = $p < 0,001$.

3.2.1.8. Histomorphologische Auswertung

Um mögliche histomorphologische Veränderungen des Dünndarms nach der Perfusion zu ermitteln, wurden Gewebeproben nach dem Versuch fixiert und für die histomorphologische Analyse aufbereitet. Die Zählung der intakten und geschädigten Villi erfolgte als Doppelbestimmung in PAS und HE gefärbten Längsschnitten (Abbildung 29). Unter Kontrollbedingungen wurde ein mittlerer Histoscore von $0,61 \pm 0,08$ bestimmt (Abbildung 30).

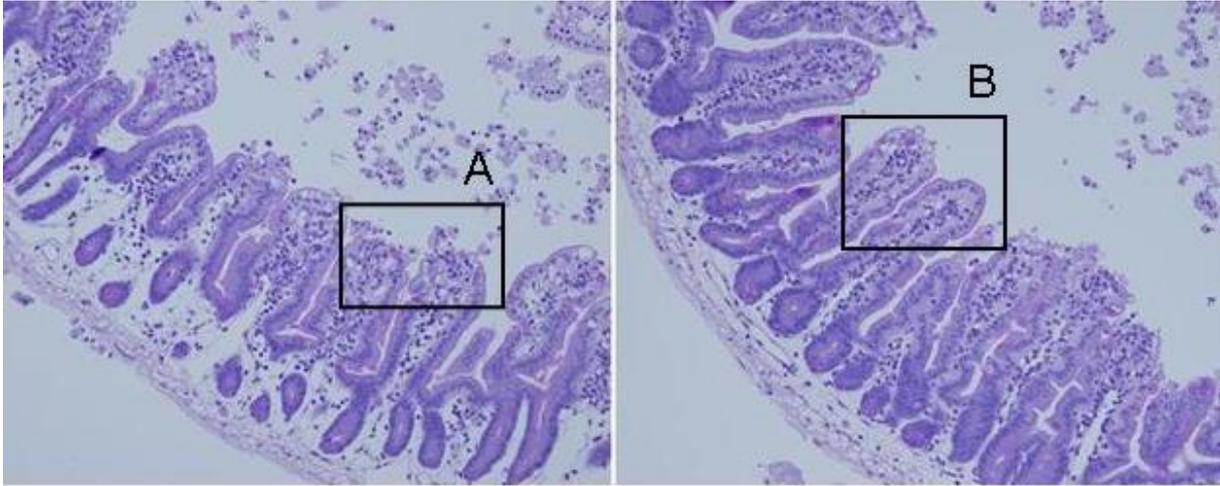


Abbildung 29: Längsschnitte vom isoliert perfundierten Darm (PAS-Färbung). Sicht auf die Zotten und die Enterozyten, links antimesenteriale Seite des Darms, rechts die mesenteriale Seite bei 10-facher Vergrößerung, A Villus unvollständig epithelialisiert, B vollständig epithelialisiert.

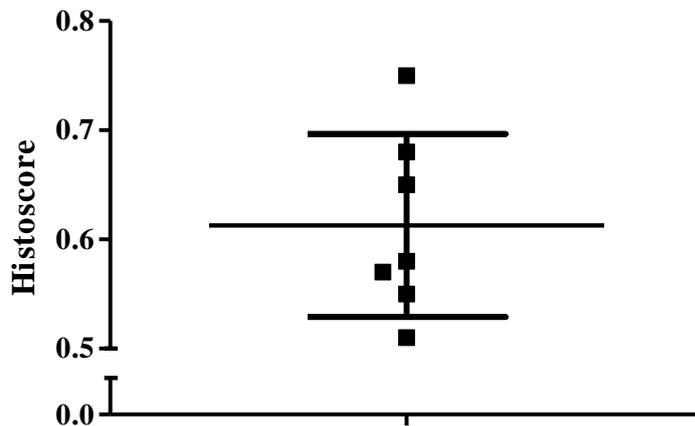


Abbildung 30: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion. Gezeigt wird der Mittelwert mit der Standardabweichung nach der Perfusion (n=7).

3.2.1.9. Analyse der Darmperistaltik

Die Darmmotilität wurde anhand der Videoaufzeichnung zu den Zeitpunkten 60-61 Minuten und 120-121 Minuten bestimmt. Dabei wurde die Anzahl der Kontraktionen eines Dünndarmsegmentes über eine Minute ermittelt. Es konnte keine signifikante Veränderung der Darmperistaltik zwischen den beiden Messzeitpunkten gezeigt werden [60-61 min ($38,4 \pm 1,1$ Kontraktionen $\cdot \text{min}^{-1}$) vs. 120-121 min ($32,2 \pm 9,9$ Kontraktionen $\cdot \text{min}^{-1}$), t-Test; $p > 0,05$; Abbildung 31].

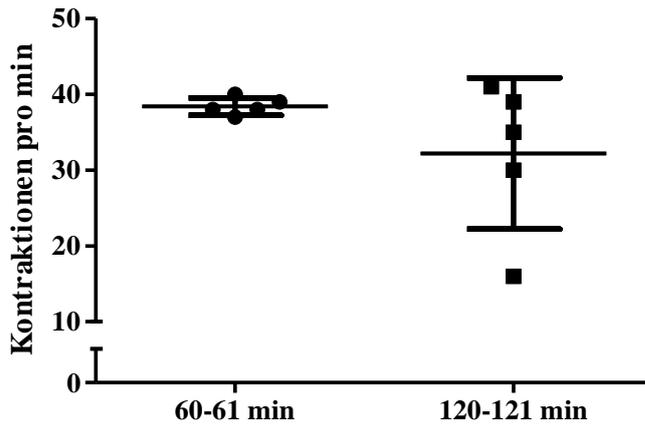


Abbildung 31: Mittlere Darmmotilität.

Die Anzahl der Kontraktionen wurde an zwei Zeitpunkten ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=5).

3.2.1.10. Zusammenfassung (Kontrollbedingungen)

Der in den Kontrollversuchen ermittelte MAP lag bei einer eingestellten Perfusionsrate von 2 ml/min konstant zwischen 43-50 mmHg. Der luminale Druck blieb bei einer Perfusionsrate von 0,06 ml/min konstant zwischen 1-3 mmHg. Ebenso zeigten die Flussraten der Effluat eine stabile Verlauf über die Versuchsdauer. Dies deutet auf eine intakte Barrierefunktion ohne signifikante Flüssigkeitsverschiebungen zwischen den verschiedenen Kompartimenten hin. Die FITC-Dextran-Messungen zeigten einen Anstieg der lymphatischen FITC-Dextran-Konzentration bis Minute 45. Danach blieb die Konzentration konstant bei ca. 50 % der vaskulär eingestellten FITC-Dextran-Konzentration. Der venöse und luminale FITC-Dextran-Transfer blieb im Versuchszeitraum stabil, ein signifikanter Anstieg des FITC-Dextran-Transfers war nur in der lymphatischen Fraktion nachweisbar. Dies deutet ebenfalls auf eine intakte Barrierefunktion mit eingeschränkter Permeabilität für das vaskulär applizierte FITC-Dextran in das Interstitium (Lymphe) und ins Darmlumen hin. Weitere Kontroll-Parameter wie das Darmgewicht, Galaktoseaufnahme, pH-Wert, Darmperistaltik und Sauerstoffaufnahme des Darms zeigten keine signifikanten Änderungen im Versuchsverlauf. Beim Laktat zum Pyruvat Verhältnis konnte ein signifikanter Abfall mit einer Stabilisierung nach 60 Minuten beobachtet werden. Die sinkende Laktat-Konzentration deutet auf einen aeroben Stoffwechsel des Dünndarms während der isolierten Perfusion hin. Das Feucht- zu Trockengewicht des Darms nach der Perfusion war signifikant höher als davor, was eine leichte Flüssigkeitseinlagerung suggeriert. Ebenso zeigte der Histoscore eine mäßige Schädigung der Enterozyten nach der Perfusion an.

3.2.2. PAF-Stimulation

Zur Validierung des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells wurde der Einfluss einer PAF-Stimulation auf die Flüssigkeitshomöostase, Barrierefunktion, metabolische Aktivität, Histomorphologie und weiteren Parameter untersucht. PAF löst als akuter Entzündungsmediator direkte physiologische und funktionelle Effekte aus, die auch im Rattendünndarm-Modell [29] gezeigt wurden. Es sollten die messbaren pathophysiologischen Veränderungen durch den vaskulären PAF-Stimulus ermittelt und die Einsatzmöglichkeiten des Modells untersucht werden. Die Perfusionsparameter für die Gruppe mit der PAF-Stimulation entsprach den Kontrollbedingungen (siehe 3.2.1). Die Stimulation mit PAF erfolgte nach Minute 60 durch Bolusgabe von 12,5 pmol PAF gelöst in 50 µl vaskulärem Puffer.

3.2.2.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck

Um mögliche vasokonstriktive Effekte einer PAF-Stimulation auf den isoliert perfundierten Maudünndarm zu ermitteln, wurde der intraarterielle und intraluminale Druck des Dünndarms gemessen.

Aus den Daten konnte ein signifikanter intraarterieller Druckanstieg nach Applikation des PAF-Bolus gezeigt werden [30-45 min ($46,12 \pm 4,46$ mmHg) vs. 60-63 min ($53,37 \pm 4,16$ mmHg); $p < 0,05$]. Luminal konnte keine signifikante Druckveränderung nach dem PAF-Bolus gezeigt werden (Abbildung 32). Der Vergleichszeitraum nach der PAF-Applikation wurde auf 3 Minuten gesetzt, da das PAF nach dieser Zeit aus dem isoliert perfundierten Dünndarm gespült wurde und nicht mehr wirksam war.

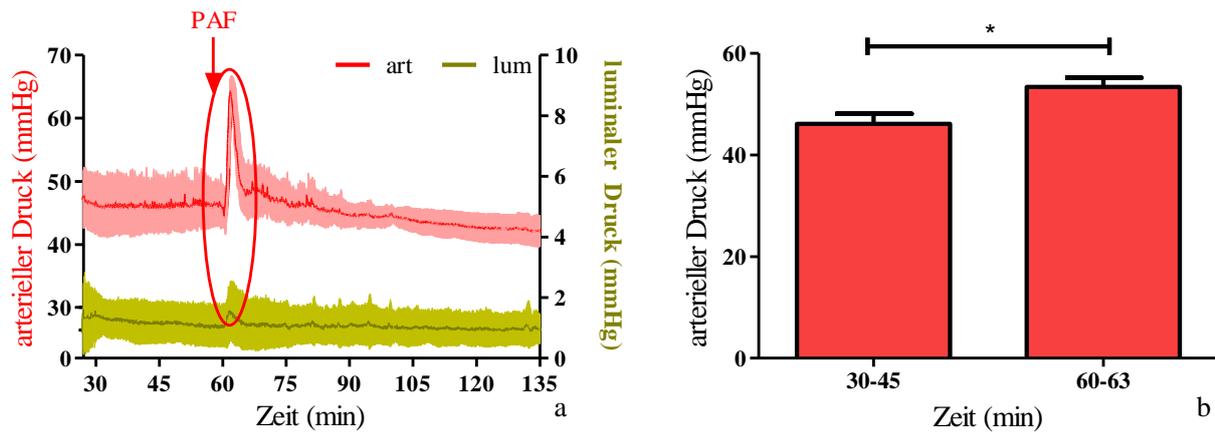


Abbildung 32: Mittlerer intraarterieller und intraluminale Druck mit PAF-Stimulus bei Minute 60. a gezeigt werden der arterielle (rot, linke Y-Achse) und luminaler Druck (gelb, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung, der rote Pfeil zeigt den Zeitpunkt der PAF Bolusgabe. b Vergleich des mittleren intraarteriellen Drucks zwischen 30-40 min vs. 60-63 min mit der Standardabweichung (n=5); t-Test * = $p < 0,05$.

3.2.2.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss

Sowohl die venöse, die lymphatische als auch die luminaler Flussrate blieben über den Versuchsverlauf konstant und wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (Abbildung 33). Die PAF-Bolusgabe hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Flüssigkeitsverschiebung.

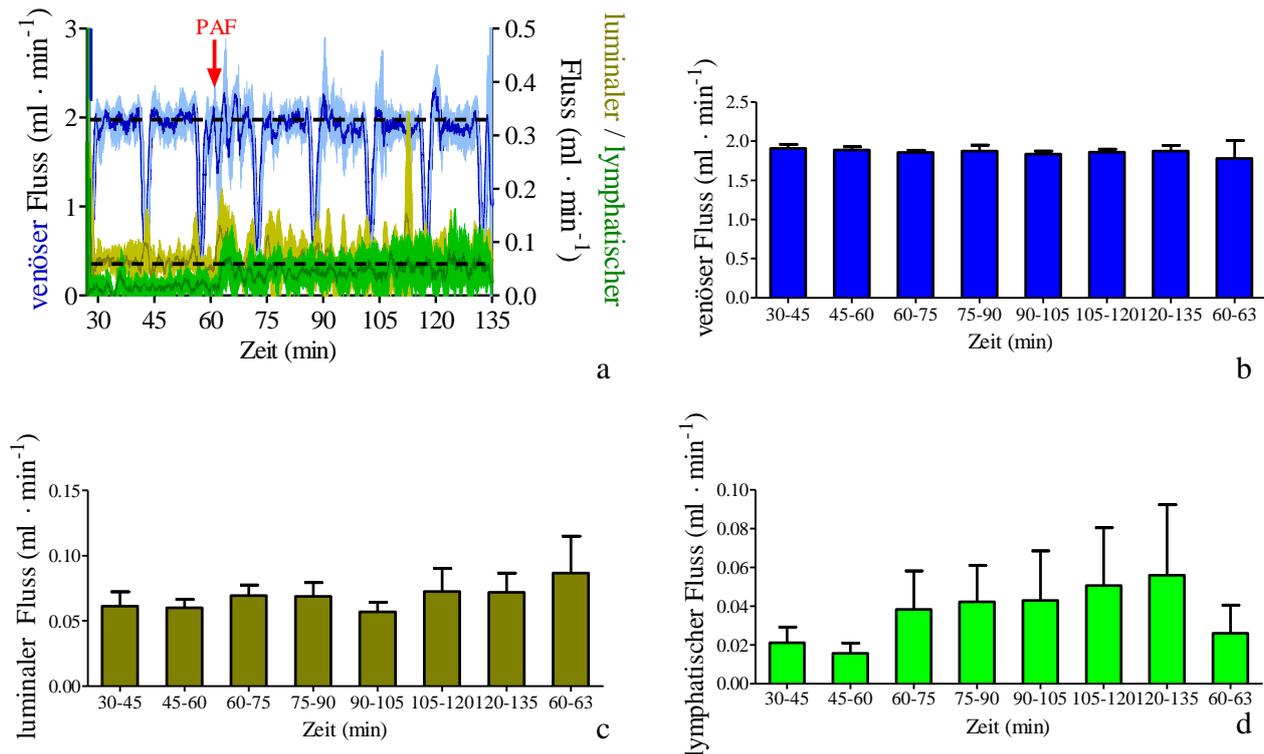


Abbildung 33: Mittlere venöse, luminalen und lymphatischen Flussrate mit PAF-Stimulus bei Minute 60. Gezeigt werden in a die venöse (blau, linke Y-Achse), luminalen (gelb, rechte Y-Achse) und lymphatischen Flussraten (grün, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung ($n=5$). Die schwarz gestrichelten Linien markieren die voreingestellte Perfusionsgeschwindigkeit der vaskulären (2 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) und luminalen (0,06 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) Perfusion (Erwartungswerte), der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der PAF-Bolusgabe. Die Flussraten wurden aus den Gewichtsdaten der Effluats berechnet. Die venösen Artefakte in 15-minütigen Abständen wurden durch die Probenentnahmen verursacht und stellten keinen tatsächlichen Abfall der Flussrate dar. In b wird die mittlere venöse Flussrate, in c die mittlere luminalen Flussrate und in d die mittlere lymphatischen Flussrate mit der Standardabweichung gezeigt.

3.2.2.3. Barrierefunktion

Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der venösen und luminalen FITC-Dextran-Konzentration nach dem PAF-Stimulus gefunden werden (Abbildung 34). Die venöse FITC-Dextran-Konzentration blieb im Versuchsverlauf bei den vorgegebenen 40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ und die luminalen bei unter 2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Die lymphatischen FITC-Dextran-Konzentration war anfänglich signifikant niedriger als im weiteren Versuchsverlauf [30 min ($5,15 \pm 4,74 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. 75 min ($25,68 \pm 5,56 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 90 min ($26,34 \pm 4,04 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 105 min ($26,74 \pm 4,11 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 120 min ($26,6 \pm 4,08 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($27,36 \pm 4,0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); $p < 0,05$]. Ab Minute 45 unterschieden sich die lymphatischen FITC-Dextran-Konzentrationen nicht mehr signifikant voneinander. Diese Ergebnisse entsprechen denen unter Kontrollbedingungen ohne PAF-Stimulation.

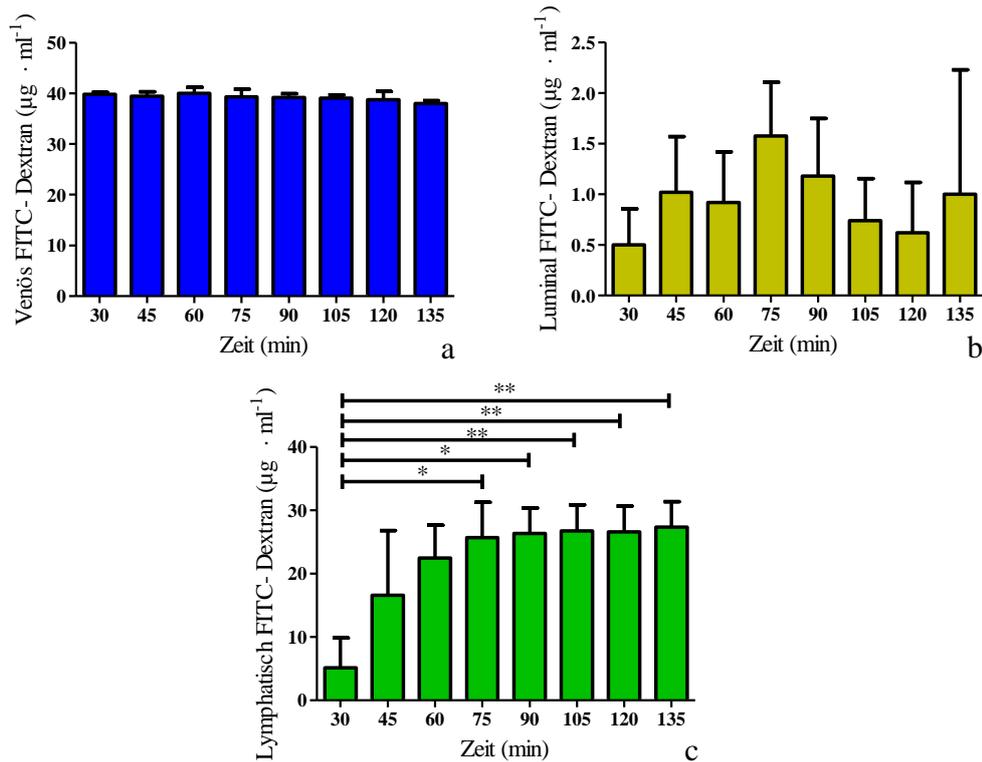


Abbildung 34: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten mit PAF-Stimulus bei Minute 60. Dargestellt sind die mittleren FITC-Dextran-Konzentrationen im venösen (a, blau) luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Kompartiment mit der Standardabweichung (n=5); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Um Veränderungen in der Permeabilität registrieren zu können, wurde die in 15 Minuten Intervallen transferierte FITC-Dextran-Menge der verschiedenen Effluat quantifiziert.

Auch beim FITC-Dextran-Transfer konnten keine signifikanten Veränderungen nach der PAF-Stimulation ermittelt werden. Im Vergleich zu Abbildung 22 unter Kontrollbedingungen kann in Abbildung 35 ein tendenziell erhöhter lymphatischer FITC-Dextran-Transfer nach PAF gezeigt werden, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant.

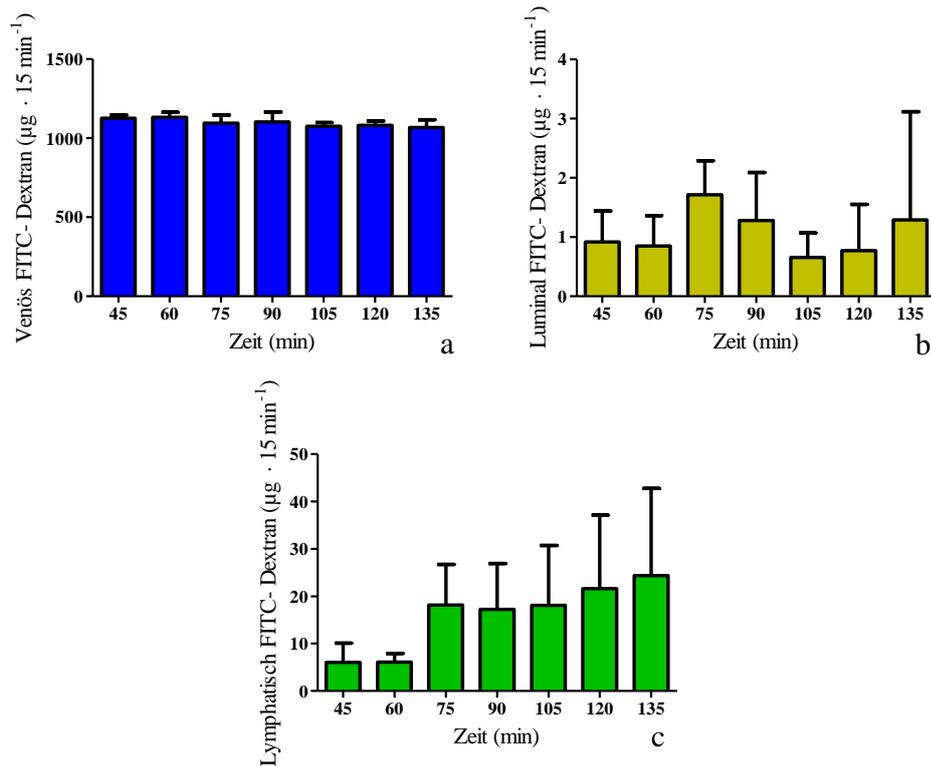


Abbildung 35: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen in den Effluaten mit PAF-Stimulus bei Minute 60.

Gezeigt wird der FITC-Dextran-Transfer mit der Standardabweichung im venösen (a, blau), luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Effluat. Dies wurde aus den Gewichtsdaten und FITC-Dextran-Konzentrationen im 15 Minuten Intervall berechnet (n=5).

3.2.2.4. Gewichtsveränderungen des Darms während der Perfusion

Um mögliche Flüssigkeitseinlagerungen des Dünndarms nach einer PAF-Stimulation registrieren zu können, wurde das Gewicht des isolierten Maudünndarms kontinuierlich über eine in die Kammer integrierte Waage bestimmt. Nach einer anfänglichen statistisch nicht signifikanten Gewichtszunahme des Dünndarms, blieb das Gewicht im weiteren Versuchsverlauf konstant (Abbildung 36). Die PAF-Stimulation hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Darmgewicht. Es kam aber zu einer kurzzeitigen tendenziellen Erhöhung des Darmgewichts im Zeitraum 60-63 min gegenüber den davor und danach liegenden Zeitabschnitten.

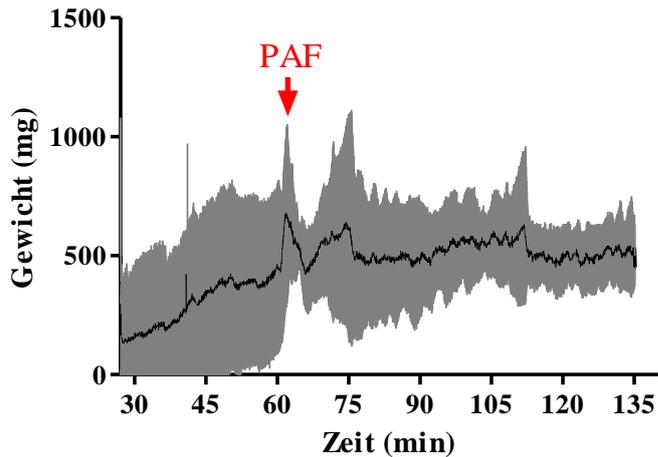


Abbildung 36: Mittlere Gewichtszunahme des Darms mit PAF-Stimulation bei Minute 60. Dargestellt wird die mittlere Gewichtszunahme des Darms mit der Standardabweichung (n=5).

3.2.2.5. Luminale Galaktoseaufnahme

Die luminale Galaktoseaufnahme wurde als Parameter für die metabolische Funktionsfähigkeit des isolierten Dünndarms bestimmt.

Die Daten zeigten eine stabile Galaktoseaufnahme des Dünndarms zwischen $0,3-0,6 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Trockengewicht Darm mit leicht fallender Tendenz zum Versuchsende (Abbildung 37). Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Galaktoseaufnahme nach der PAF-Stimulation. Ebenso ergaben statistische Analysen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen (Abbildung 24) und denen mit PAF-Stimulation. Die Galaktoseaufnahme als metabolischer Funktionsparameter wurde durch eine PAF-Stimulation nicht signifikant reduziert.

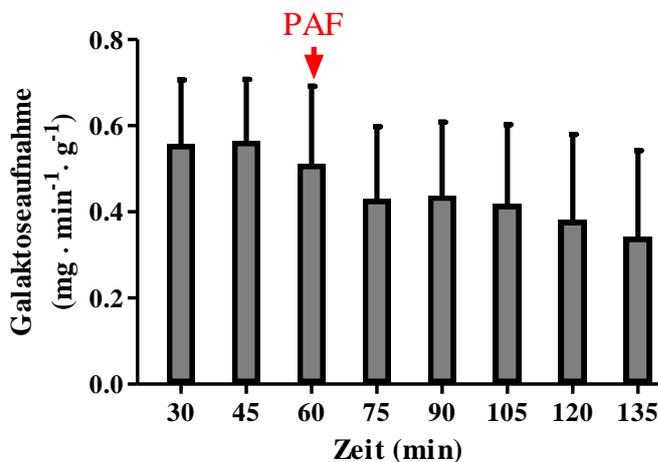


Abbildung 37: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit PAF-Stimulus bei Minute 60. Dargestellt ist die mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung. Probenentnahme alle 15 Minuten, die Galaktoseaufnahme wurde auf das Trockengewicht normiert (n=5).

3.2.2.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme

Als Parameter zum Nachweis einer ausreichenden Sauerstoffversorgung des Dünndarms wurden die Laktat- und Pyruvat-Konzentrationen bestimmt und ihr Verhältnis berechnet.

Zu Beginn der Perfusion konnten signifikant höhere Laktat zu Pyruvat Verhältnisse als zum Versuchsende ermittelt werden [30 min ($16,0 \pm 4,8$) vs. 75 min ($10,52 \pm 0,95$), 90 min ($9,08 \pm 1,28$), 105 min ($8,71 \pm 1,34$), 120 min ($8,01 \pm 0,88$), 135 min ($7,37 \pm 0,96$); $p < 0,01$]. Ab Minute 60 war kein signifikanter Abfall im Laktat zu Pyruvat Verhältnis nachweisbar (Abbildung 38). Der Vergleich zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen gegen die PAF-Stimulation ergab keine signifikanten Unterschiede.

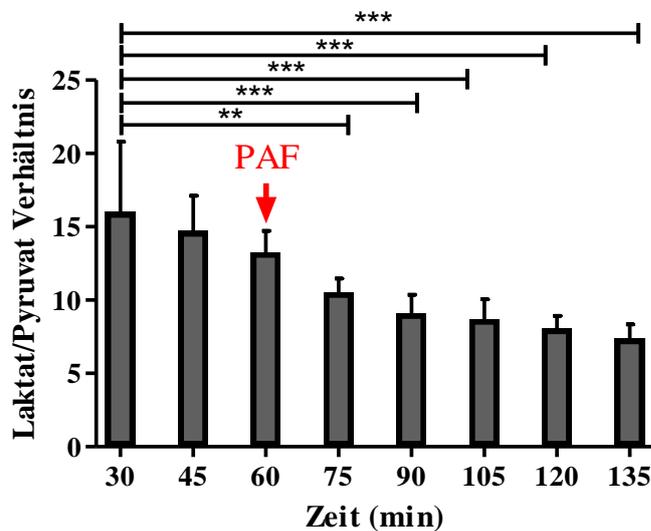


Abbildung 38: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis mit PAF-Stimulus bei Minute 60.

Verhältnis berechnet aus venösen Proben in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (n=5); einfaktorielle ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$.

Um die Stabilität der Perfusionsparameter zu bestimmen, wurde der pH-Wert des vaskulären Puffers kontinuierlich überwacht.

Der pH-Wert blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant bei 7,38 und unterschied sich nicht von dem unter Kontrollbedingungen (Abbildung 39).

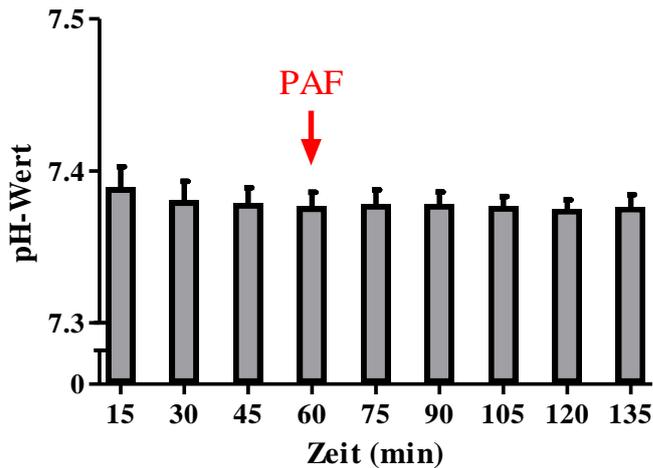


Abbildung 39: Mittlerer arterieller pH-Wert mit PAF-Stimulus bei Minute 60. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=5).

Um Veränderungen in der Sauerstoffaufnahme des Dünndarms nach der PAF-Stimulation untersuchen zu können, wurde der Sauerstoffpartialdruck bestimmt und die Differenz aus der arteriellen und venösen Probe gebildet.

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme des Darms nach der PAF-Stimulation. Ebenso fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen und denen mit PAF-Stimulation (Abbildung 40).

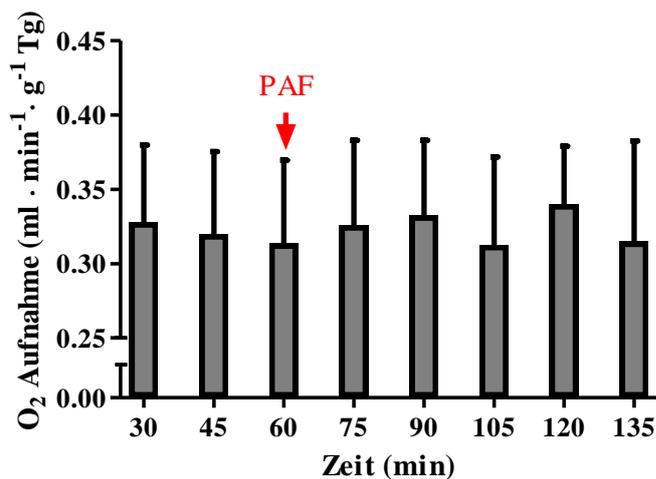


Abbildung 40: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms mit PAF-Stimulus bei Minute 60. Sauerstoffaufnahme normiert auf das Trockengewicht des Darms mit der Standardabweichung (n=5).

3.2.2.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht

Um zusätzliche Flüssigkeitseinlagerungen im Dünndarmgewebe nach der Perfusion ermitteln zu können, wurde das Feucht- zu Trockengewicht des Darms vor und nach der Perfusion bestimmt. Nach der Perfusion unterschied sich das Feucht- zu Trockengewicht zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen und denen mit PAF-Stimulation [Kontrollbedingung (W/d 2 $5,43 \pm 0,19$) vs. PAF-Stimulation (W/d 2 $5,66 \pm 0,35$); $p > 0,05$] nicht signifikant voneinander (Abbildung 41). Eine PAF-Stimulation führte somit zu keiner erhöhten Flüssigkeitseinlagerung im Dünndarmgewebe im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Das Feucht- zu Trockengewicht war nach der Perfusion signifikant höher als vor der Perfusion (W/d 2 $5,65 \pm 0,35$ vs. W/d 1 $4,42 \pm 0,21$; $p < 0,001$).

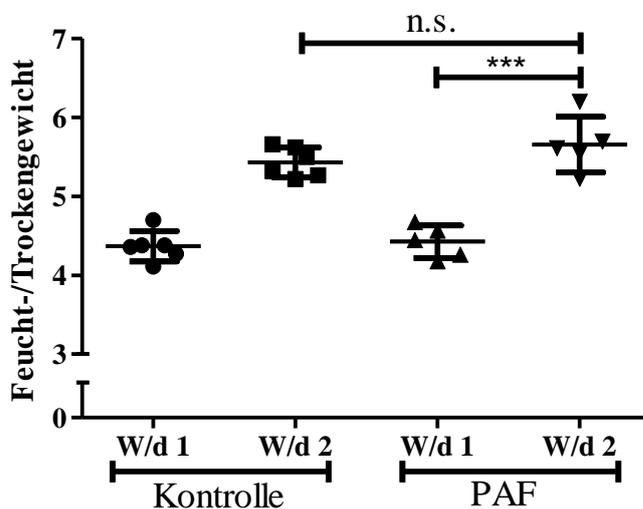


Abbildung 41: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms mit PAF-Stimulus im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

Dargestellt werden die Mittelwerte mit der Standardabweichung, W/d 1 = Probe vor Perfusion, W/d 2 = Probe nach Perfusion. Die Anzahl der Replikate unter Kontrollbedingungen betragen $n=6$ und mit PAF-Stimulation $n=5$; t-Test; *** = $p < 0,001$; n.s. = $p > 0,05$.

3.2.2.8. Histomorphologische Auswertung

Um mögliche histomorphologische Veränderungen des Dünndarms nach der Perfusion zu ermitteln, wurden Gewebeproben nach dem Versuch fixiert und für die histomorphologische Analyse aufbereitet.

In der PAF-Gruppe lag der mittlere Histoscore bei $0,65 \pm 0,12$ und unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe $0,61 \pm 0,09$ (Abbildung 42). Ein höherer Histoscore deutet auf einen geringeren morphologischen Schaden an den Enterozyten hin.

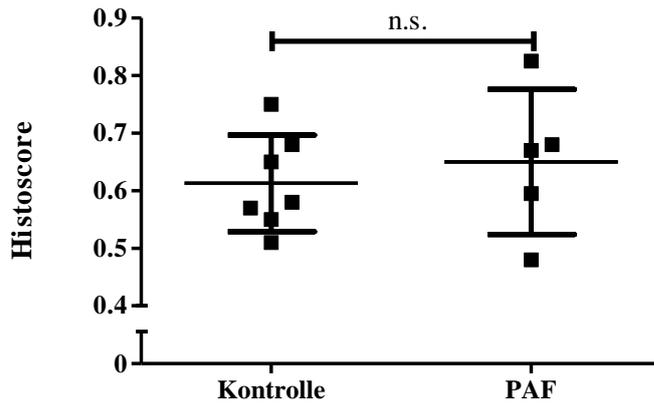


Abbildung 42: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit PAF-Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung unter Kontrollbedingungen (n=7) und mit PAF-Stimulus bei Minute 60 (t=5); t-Test; n.s. = $p > 0,05$.

3.2.2.9. Analyse der Darmperistaltik

Die Darmmotilität wurde anhand der Videoaufzeichnung zu den Zeitpunkten 60-61 Minuten und 120-121 Minuten bestimmt. Dabei wurde die Anzahl der Kontraktionen eines Dünndarmsegmentes über eine Minute ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Darmmotilität zwischen 60-61 min (vor PAF-Stimulation, da der PAF-Bolus eine Minute bis zum Darm benötigt) vs. 62-63 min (PAF-Stimulation) und 62-63 min vs. 120-121 min (nach PAF-Stimulation) gefunden werden. Somit hatte die PAF-Stimulation keinen signifikanten Einfluss auf die Darmmotilität. Ebenso gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen 60-61 min vs. 120-121 min (Abbildung 43).

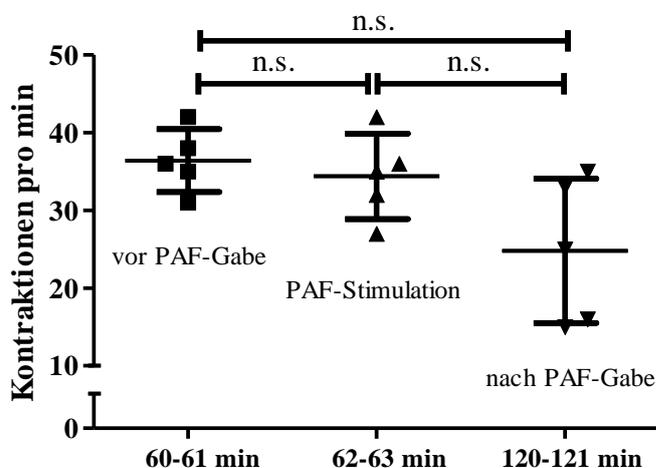


Abbildung 43: Mittlere Darmmotilität mit PAF-Stimulus bei Minute 60.

Gezeigt wird die Anzahl der Kontraktionen zum Zeitpunkt 60-61 min, 62-63 min und 120-121 min mit der Standardabweichung (n=5); t-Test; n.s. = $p > 0,05$.

3.2.2.10. Zusammenfassung (PAF-Stimulation)

Die PAF-Stimulation führte im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell zu einigen messbaren Veränderungen in den untersuchten Parametern. So konnte eine signifikante intraarterielle Druckerhöhung nach dem PAF-Bolus gezeigt werden. Die Analysen der luminalen und venösen Flussraten des lymphatischen FITC-Dextran-Transfers und des Darmgewichts zeigten sichtbare Veränderungen nach einer PAF-Stimulation, die jedoch nicht statistisch signifikant waren. Die mittlere Gewichtszunahme, die Galaktoseaufnahme, das Laktat zu Pyruvat Verhältnis, der pH-Wert, die Sauerstoffaufnahme, das Feucht- zu Trockengewicht, der Histoscore und die Darmmotilität unterschieden sich nicht signifikant von den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen.

3.3. Anwendung des Modells

3.3.1. 3 % HES 130/0,4 (Krebs-Henseleit-Puffer) als vaskuläres Perfusat

Der isolierte Maudünndarm wurde zur Equilibrierung die ersten 60 Minuten unter Kontrollbedingungen mit 3 % BSA-Puffer perfundiert, um Referenzwerte zu erhalten, anhand derer die Validität des Versuchs abgeschätzt werden konnte. Erst wenn die in der Äquilibration ermittelten Druck- und Flussdaten denen unter Kontrollbedingungen entsprachen, wurde der vaskuläre Puffer auf 3 % HES 130/0,4 gewechselt (siehe 2.1.2) und der BSA-haltige Puffer aus dem Perfusionssystem gespült. Veränderungen, die nach dem Pufferwechsel eintraten, konnten somit auf die Perfusion mit HES 130/0,4 zurückgeführt werden.

3.3.1.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck

Um mögliche vasokonstriktive Effekte einer HES 130/0,4-Perfusion auf den isoliert perfundierten Maudünndarm zu ermitteln, wurde der intraarterielle und intraluminale Druck des Dünndarms gemessen. Der intraarterielle Druck stieg nach der Pufferumstellung auf HES 130/0,4 an, jedoch waren die Unterschiede in den verschiedenen Zeitintervallen nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA) 30-45 min ($46,48 \pm 3,71$ mmHg), 45-60 min ($45,1 \pm 2,81$ mmHg), 60-75 min ($63,58 \pm 11,85$ mmHg), 75-90 min ($60,67 \pm 13,19$ mmHg), 90-105 min ($53,8 \pm 7,36$ mmHg), 105-120 min ($50,26 \pm 3,4$ mmHg), 120-135 min ($48,92 \pm 2,39$ mmHg) (Abbildung 44). Der Vergleich der intraarteriellen Druckdaten unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 19) mit denen der HES 130/0,4 Gruppe (zweifaktorielle ANOVA) zeigte einen signifikant höheren Druck in den Zeitintervallen 60-75 min und 75-90 min nach der Umstellung auf die HES 130/0,4-Perfusion [Kontrolle 60-75 min ($45,73 \pm 5,33$ mmHg) vs. HES 130/0,4 60-75 min ($63,56 \pm 11,85$ mmHg); $p < 0,001$; Kontrolle 75-90 min ($45,02 \pm 4,67$) vs. HES 130/0,4 75-90 min ($60,67 \pm 13,19$); $p < 0,001$]. Beim intraluminalen Druck gab es keine signifikanten Unterschiede nach dem Wechsel auf HES 130/0,4. Ebenso waren unter HES 130/0,4 keine signifikanten Unterschiede zum intraluminalen Druck unter Kontrollbedingungen sichtbar.

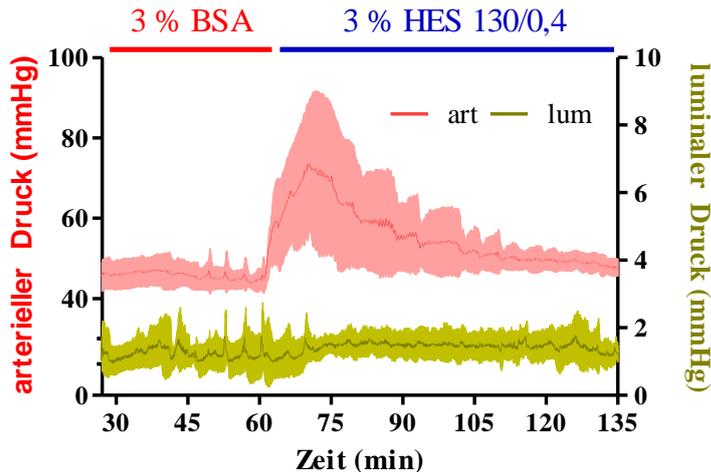


Abbildung 44: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60.

Dargestellt wird der intraarterielle (rot, linke Y-Achse) und intraluminale Druck (gelb, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung ($n=4$).

3.3.1.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss

Anhand der berechneten Flussraten konnten Rückschlüsse auf die Flüssigkeitsverschiebungen innerhalb der verschiedenen Kompartimente gezogen werden.

Nach dem Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 130/0,4 konnte eine statistisch nicht signifikante Reduktion der venösen Flussrate beobachtet werden [30-45 min ($1,95 \pm 0,12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($1,85 \pm 0,09 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$)]. Es konnte jedoch eine signifikante Zunahme (einfaktorielle ANOVA) sowohl der luminalen Flussrate [30-45 min ($0,06 \pm 0,01 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. 105-120 min ($0,14 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($0,19 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,001$] als auch der lymphatischen Flussrate nach dem Wechsel auf HES 130/0,4 gezeigt werden [30-45 min ($0,011 \pm 0,004 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. 105-120 min ($0,027 \pm 0,003 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-130 min ($0,033 \pm 0,005 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,05$; Abbildung 45]. Ein Vergleich der Flussraten unter Kontrollbedingungen (Abbildung 20) mit der HES 130/0,4-Perfusion (zweifaktorielle ANOVA) zeigte nur für die luminalen Flussrate signifikante Unterschiede [Kontrolle 90-105 min ($0,006 \pm 0,004 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 105-120 min ($0,063 \pm 0,005 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($0,067 \pm 0,009 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. HES 130/0,4 90-105 min ($0,1 \pm 0,01 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 105-120 min ($0,14 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($0,19 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,01$].

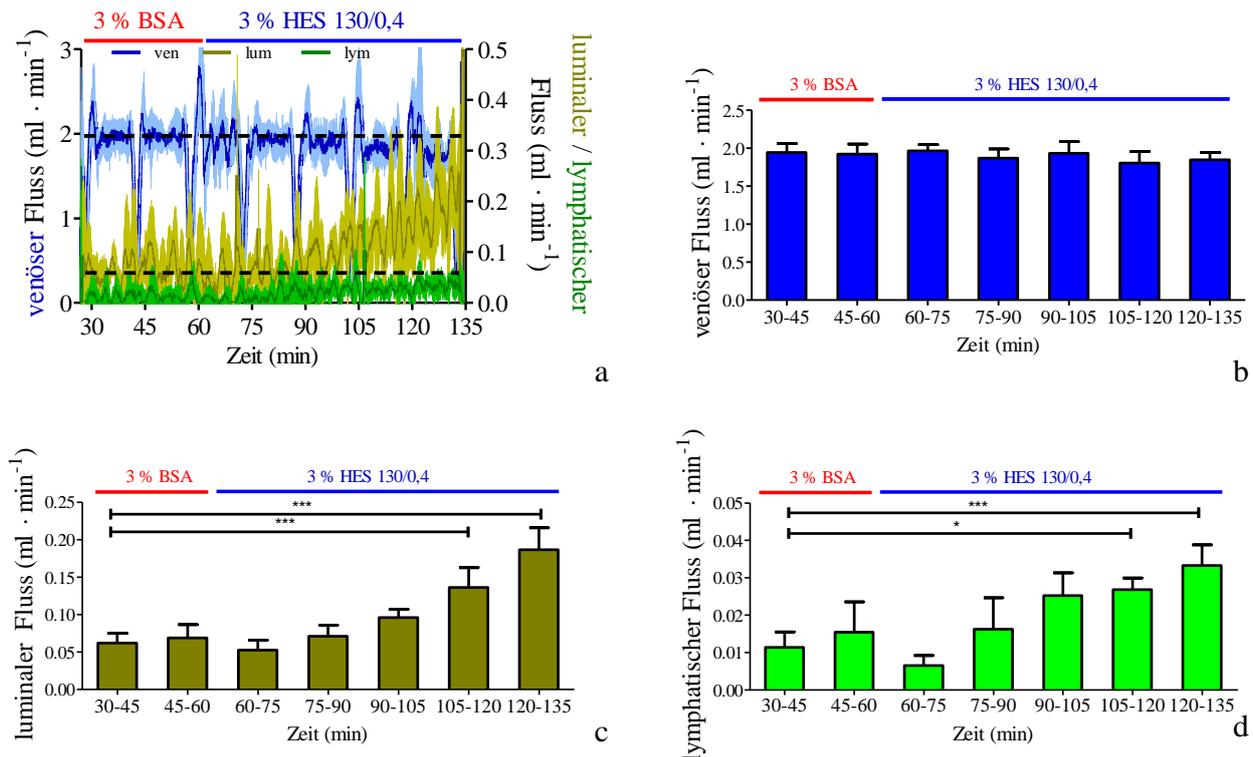


Abbildung 45: Mittlere venöse, luminalen und lymphatische Flussrate mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60.

Gezeigt werden in a die venösen (blau, linke Y-Achse), luminalen (gelb, rechte Y-Achse) und lymphatischen Flussraten (grün, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung ($n=4$). Die schwarz gestrichelten Linien markieren die voreingestellte Perfusionsgeschwindigkeit der vaskulären (2 ml/min) und luminalen (0,06 ml/min) Perfusion (Erwartungswerte). Die Flussraten wurden aus den Gewichtsdaten der Effluat berechnet. Die venösen Artefakte in 15-minütigen Abständen wurden durch die Probenentnahmen verursacht und stellten keinen tatsächlichen Abfall der Flussrate dar. In b wird die mittlere venöse Flussrate, in c die mittlere luminalen Flussrate und in d die mittlere lymphatische Flussrate mit der Standardabweichung gezeigt; einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

3.3.1.3. Barrierefunktion

Um Veränderungen in der intestinalen Barrierefunktion nach dem Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 130/0,4 nachweisen zu können, wurde die Konzentration des vaskulär applizierten FITC-Dextran in den verschiedenen Effluat untersucht. Je nach Grad der Permeabilisierung werden unterschiedliche Konzentrationen von FITC-Dextran im lymphatischen und luminalen Effluat gemessen.

Sowohl im venösen, luminalen als auch im lymphatischen Effluat konnten signifikante Unterschiede in der FITC-Dextran-Konzentration nach dem Wechsel auf den HES 130/0,4-Puffer nachgewiesen werden (einfaktorische ANOVA) (Abbildung 46). Es kam im venösen Effluat zwischen 30 min ($40,02 \pm 1,19 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 45 min ($39,62 \pm 1,28 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 60 min ($39,42 \pm 1,61 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. 120 min ($35,66 \pm 1,11 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) und 135 min ($35,96 \pm 1,18 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) zu einem signifikanten Abfall in der FITC-Dextran-Konzentration ($p < 0,001$). Im

luminalen Effluat war eine stetige signifikante Erhöhung der FITC-Dextran-Konzentration nach dem Wechsel auf HES 130/0,4 nachweisbar [30 min ($1,97 \pm 2,29 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 45 min ($1,1 \pm 0,69 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 60 min ($0,8 \pm 0,37 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 75 min ($0,27 \pm 0,15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 90 min ($0,88 \pm 0,41 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 105 min ($3,34 \pm 1,46 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. 120 min ($9,08 \pm 2,41 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($14,04 \pm 2,49 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); $p < 0,001$]. Die lymphatische FITC-Dextran-Konzentration stieg über den Versuchszeitraum signifikant an [45 min ($13,88 \pm 10,57 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. 120 min ($30,14 \pm 4,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($30,92 \pm 4,34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); $p < 0,05$]. Im Vergleich zur Gruppe unter Kontrollbedingungen (Abbildung 21) konnten signifikant höhere FITC-Dextran-Konzentrationen im luminalen Effluat nach HES 130/0,4 gefunden werden (zweifaktorielle ANOVA) (Kontrolle 105 min ($0,49 \pm 0,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 120 min ($0,47 \pm 0,27 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($0,6 \pm 0,37 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. HES 130/0,4 105 min ($3,34 \pm 1,46 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 120 min ($9,08 \pm 2,41 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($14,04 \pm 2,49 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); $p < 0,001$).

Die lymphatischen FITC-Dextran-Konzentrationen waren gegenüber denen unter Kontrollbedingungen nicht signifikant unterschiedlich.

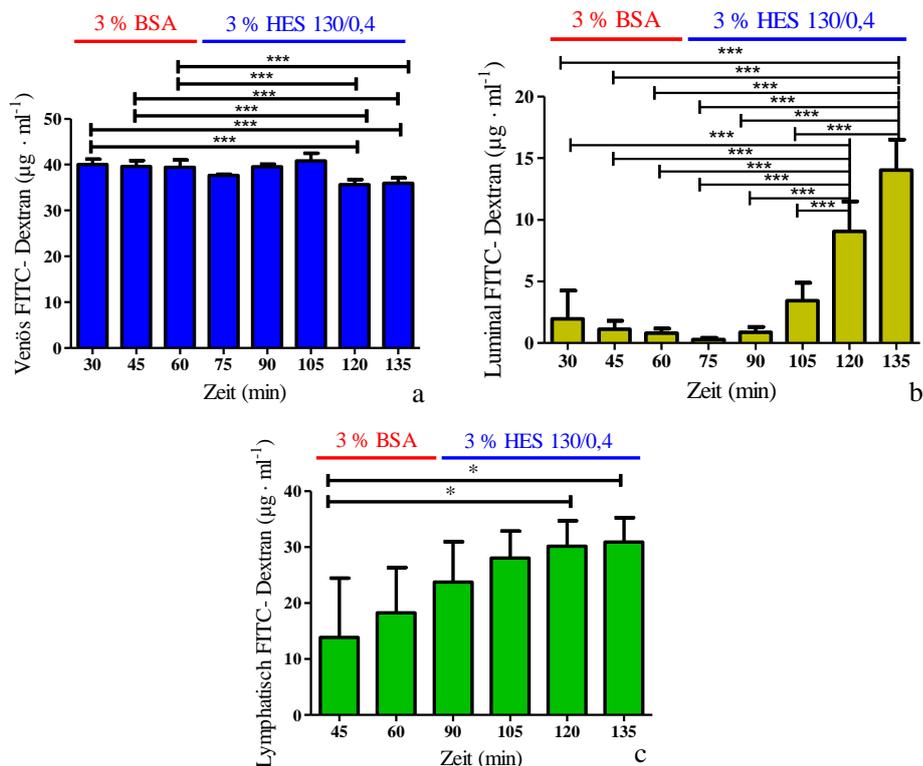


Abbildung 46: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60.

Dargestellt sind die mittleren FITC-Dextran-Konzentrationen im venösen (a, blau) luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Kompartiment mit der Standardabweichung ($n=4$); einfaktorielle ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Um Veränderungen in der Permeabilität registrieren zu können, wurde die in 15 Minuten Intervallen transferierte FITC-Dextran-Menge der verschiedenen Effluat quantifiziert.

Beim FITC-Dextran-Transfer gab es im venösen Effluat keine signifikanten Veränderungen (einfaktorielle ANOVA) nach der Umstellung des vaskulären Puffers auf HES 130/0,4 (Abbildung 47). Der luminale FITC-Dextran-Transfer stieg nach dem Wechsel auf HES 130/0,4 signifikant an [45 min ($1,22 \pm 0,8 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) 60 min ($0,75 \pm 0,19 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 75 min ($0,18 \pm 0,17 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($1,12 \pm 0,59 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. 120 min ($19,41 \pm 10,13 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,05$ und 45 min ($1,22 \pm 0,8 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 60 min ($0,75 \pm 0,19 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 75 min ($0,18 \pm 0,17 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($1,12 \pm 0,59 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. 135 min ($38,86 \pm 14,04 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,001$]. Ebenso kam es zu einer signifikanten Zunahme im lymphatischen FITC-Dextran-Transfer nach dem Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer [45 min ($2,1 \pm 2,03 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. 105 min ($9,92 \pm 2,78 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($11,38 \pm 0,4 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($14,87 \pm 3,89 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,05$]. Vergleiche zwischen der Gruppe unter Kontrollbedingungen mit der HES 130/0,4-Gruppe (zweifaktorielle ANOVA) zeigten eine signifikante Reduktion des venösen [Kontrolle 75 min ($1195 \pm 50,87 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($1156 \pm 32,99 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 105 min ($1139 \pm 57,67 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($1162 \pm 50,33 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($1126 \pm 39,07 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. HES 130/0,4 75 min ($1092 \pm 31,04 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($1011 \pm 8,37 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 105 min ($1064 \pm 87,75 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($990 \pm 72,43 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($989 \pm 45,29 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,05$] sowie einen signifikanten Anstieg des luminalen [Kontrolle 120 min ($0,45 \pm 0,27 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($0,6 \pm 0,37 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. HES 130/0,4 120 min ($19,4 \pm 10,13 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($38,8 \pm 14,03 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,001$] und lymphatischen FITC-Dextran-Transfers [Kontrolle 105 min ($5,41 \pm 2,43 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($6,64 \pm 2,27 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. HES 130/0,4 105 min ($9,92 \pm 2,78 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($11,37 \pm 0,48 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,05$ und Kontrolle 135 min ($8,69 \pm 2,38 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. HES 130/0,4 135 min ($14,87 \pm 3,89 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,01$].

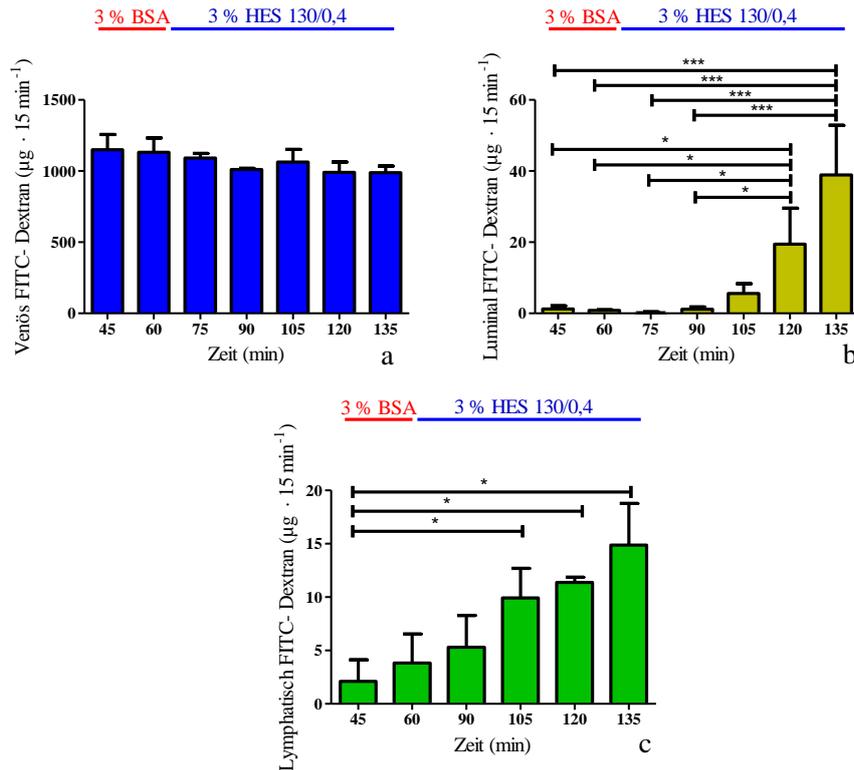


Abbildung 47: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen in den Effluaten mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60.

Gezeigt wird der FITC-Dextran-Transfer mit der Standardabweichung im venösen (a, blau), luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Effluat. Dies wurde aus den Gewichtsdaten und FITC-Dextran-Konzentrationen im 15 Minuten Intervall berechnet (n=4); einfaktoruelle ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

3.3.1.4. Gewichtsveränderungen des Darms während der Perfusion

Um mögliche Flüssigkeitseinlagerungen des Dünndarms nach dem Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 130/0,4 registrieren zu können, wurde das Gewicht des isolierten Maudünndarms kontinuierlich über eine in die Kammer integrierte Waage bestimmt. Nach einer anfänglichen statistisch nicht signifikanten Gewichtszunahme des Dünndarms bis Minute 75 blieb das Gewicht im weiteren Versuchsverlauf konstant (Abbildung 48). Der Vergleich des Darmgewichts unter Kontrollbedingungen (Abbildung 23) mit der HES 130/0,4-Perfusion ergab keine signifikanten Unterschiede. Ein signifikanter Einfluss einer HES 130/0,4-Perfusion auf das Darmgewicht des isoliert perfundierten Maudünndarms konnte nicht gezeigt werden.

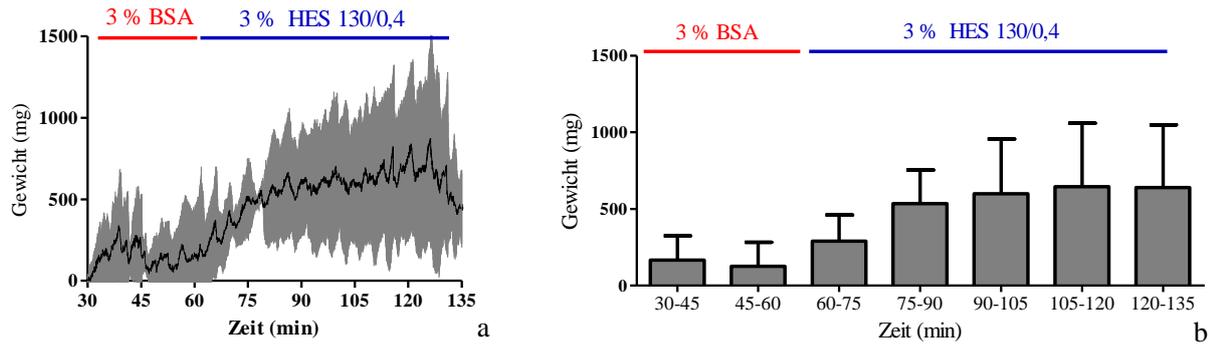


Abbildung 48: Mittlere Gewichtszunahme des Darms mit Wechsel zum HES 130/0,4 Puffer bei Minute 60. Dargestellt wird die mittlere Gewichtszunahme des Darms mit der Standardabweichung (a) und die mittlere Gewichtszunahme in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (b) (n=4).

3.3.1.5. Luminale Galaktoseaufnahme

Um die Funktionsfähigkeit des isoliert perfundierten Maudünndarms zu belegen, wurde als Parameter exemplarisch die luminale Galaktoseaufnahme bestimmt.

Die Perfusion mit HES 130/0,4 führte zu einer signifikanten (einfaktorielle ANOVA) Verringerung der luminalen Galaktoseaufnahme des Dünndarms [45 min ($0,62 \pm 0,3 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) vs. 105 min ($0,19 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), 120 min ($0,09 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), 135 min ($0,04 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$); $p < 0,05$] (Abbildung 49). Der Vergleich zwischen Kontrollbedingungen (Abbildung 24) und der HES 130/0,4-Perfusion (zweifaktorielle ANOVA) zeigte einen signifikanten Rückgang der Galaktoseaufnahme in der HES 130/0,4 Gruppe (Kontrolle 120 min ($0,26 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), 135 min ($0,26 \pm 0,11 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), vs. HES 130/0,4 120 min ($0,097 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), 135 min ($0,04 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$); $p < 0,001$).

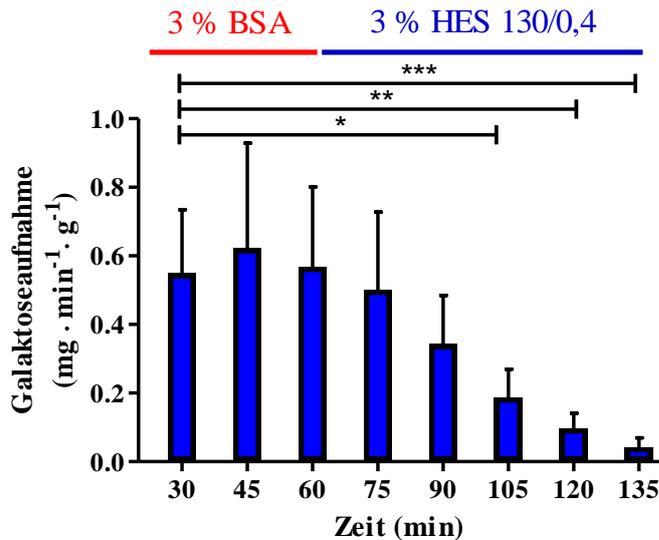


Abbildung 49: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60.

Dargestellt ist die mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung. Probenentnahme alle 15 Minuten, die Galaktoseaufnahme wurde auf das Trockengewicht normiert (n=5); einfaktorielle ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

3.3.1.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme

Als Parameter zum Nachweis einer ausreichenden Sauerstoffversorgung des Dünndarms wurden die Laktat- und Pyruvat-Konzentrationen bestimmt und ihr Verhältnis berechnet.

Zu Beginn der Perfusion konnten signifikant höhere Laktat zu Pyruvat Verhältnisse als zum Versuchsende (einfaktorielle ANOVA) ermittelt werden [30 min ($22,69 \pm 4,37$) vs. 90 min ($11,32 \pm 4,6$), 105 min ($9,39 \pm 2,04$), 120 min ($8,97 \pm 2,86$), 135 min ($7,99 \pm 1,93$); p < 0,01].

Ab Minute 60 war kein signifikanter Abfall im Laktat zu Pyruvat Verhältnis nachweisbar (Abbildung 50). Der Vergleich zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen (Abbildung 25) gegen die HES 130/0,4 Perfusion ergab keine signifikanten Unterschiede im Laktat zu Pyruvat Verhältnis.

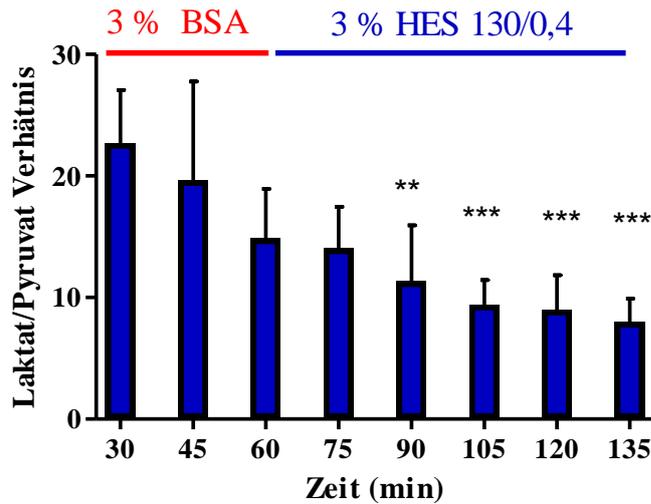


Abbildung 50: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60. Verhältnis berechnet aus venösen Proben in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (n=5); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$.

Um die Stabilität der Perfusionsparameter zu bestimmen, wurde unter anderem der pH-Wert des vaskulären Puffers kontinuierlich überwacht.

Der pH-Wert blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant bei ca. 7,38 und unterschied sich nicht von dem unter Kontrollbedingungen (Abbildung 51). Der Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 130/0,4 verursachte keine signifikanten Veränderungen im arteriellen pH-Wert.

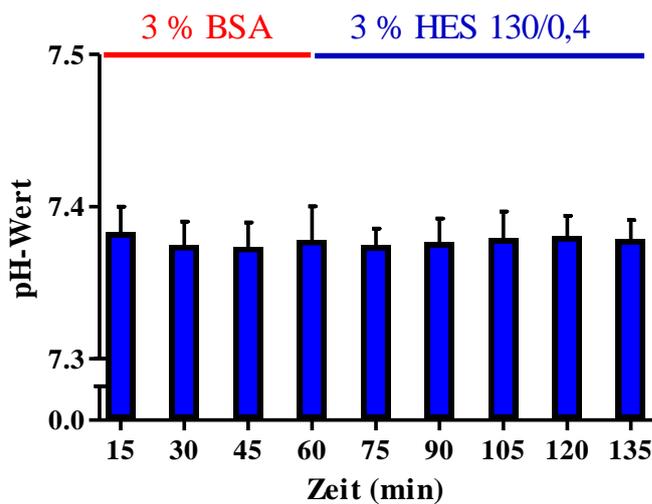


Abbildung 51: Mittlerer arterieller pH-Wert mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=5).

Um Veränderungen in der Sauerstoffaufnahme des Dünndarms nach dem Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer untersuchen zu können, wurde der Sauerstoffpartialdruck bestimmt und die Differenz aus der arteriellen und venösen Probe gebildet.

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme des Darms nach dem Wechsel auf die HES 130/0,4-Perfusion (Abbildung 52). Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede in der Sauerstoffaufnahme zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen und denen mit HES 130/0,4.

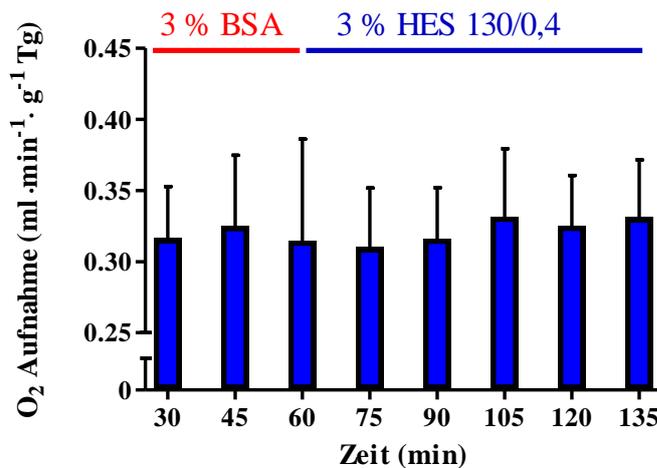


Abbildung 52: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60.

Dargestellt ist die Sauerstoffaufnahme mit der Standardabweichung normiert auf das Trockengewicht des Darms (n=5).

3.3.1.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht

Um zusätzliche Flüssigkeitseinlagerungen im Dünndarmgewebe nach der Perfusion ermitteln zu können, wurde das Feucht- zu Trockengewicht des Darms vor und nach der Perfusion bestimmt. Beim Verhältnis des Feucht- zu Trockengewichts konnte nach der Perfusion mit HES 130/0,4 keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollbedingungen festgestellt werden [Kontrolle W/d 2 ($5,44 \pm 0,19$) vs. HES 130/0,4 ($5,64 \pm 0,23$); $p > 0,05$; Abbildung 53]. Analog zu den Befunden in der Kontrollgruppe konnte eine Zunahme des Feucht- zu Trockengewichts nach der Perfusion mit HES 130/0,4 gezeigt werden [HES 130/0,4 W/d 1 ($4,26 \pm 0,26$) vs. HES 130/0,4 W/d 2 ($5,64 \pm 0,23$); $p < 0,01$]

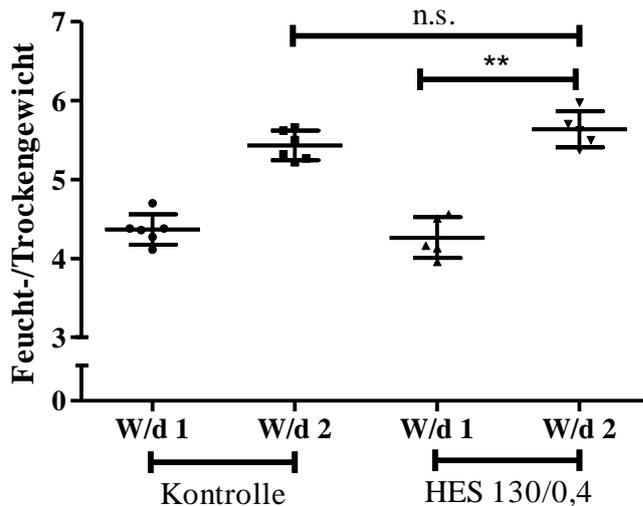


Abbildung 53: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms unter Kontrollbedingungen und mit HES 130/0,4-Puffer.

Dargestellt werden die Mittelwerte mit der Standardabweichung, W/d 1 = Probe vor Perfusion, W/d 2 = Probe nach Perfusion. Die Anzahl der Replikate unter Kontrollbedingungen ($n=6$) und mit HES 130/0,4 ($n=5$); t-Test; ** = $p < 0,01$; n.s. = $p > 0,05$.

3.3.1.8. Histomorphologische Auswertung und elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um mögliche histomorphologische Veränderungen des Dünndarms nach der Perfusion zu ermitteln, wurden Gewebeproben nach dem Versuch fixiert und für die histomorphologische Analyse aufbereitet.

Der Mittelwert des Histoscores in der HES 130/0,4-Gruppe lag bei $0,59 \pm 0,09$ und unterschied sich nicht signifikant ($p > 0,05$) von der Kontrollgruppe $0,61 \pm 0,08$ (Abbildung 54).

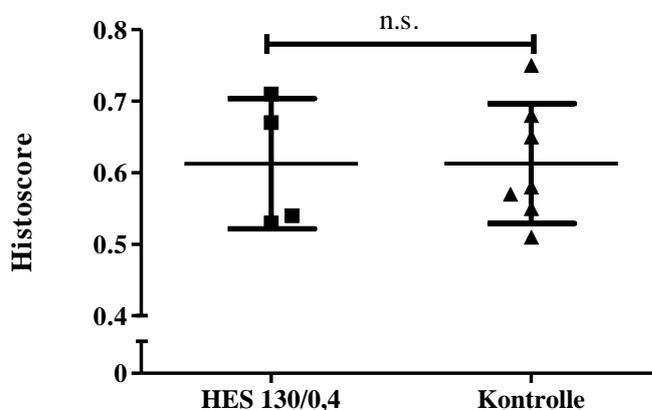


Abbildung 54: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit HES 130/0,4-Puffer.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung in der Kontrollgruppe ($n=7$) und in der HES 130/0,4-Gruppe ($n=4$); t-Test; n.s. = $p > 0,05$.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde jeweils ein Versuch unter Kontrollbedingungen und einer unter HES 130/0,4-Perfusion durchgeführt. Nach 135 Minuten Perfusion wurden die Darmstücke in Blöcke geschnitten, fixiert und weiter aufbereitet (siehe 2.5.7). Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Darmepithels konnten bei 5000-facher Vergrößerung vermehrt intrazelluläre Vakuolen nach der HES 130/0,4-Perfusion festgestellt werden. Einige Präparate wiesen erweiterte interzelluläre Spalten bis zu den Tight Junctions auf. Diese Befunde waren nach einer Perfusion unter Kontrollbedingungen nicht vorhanden.

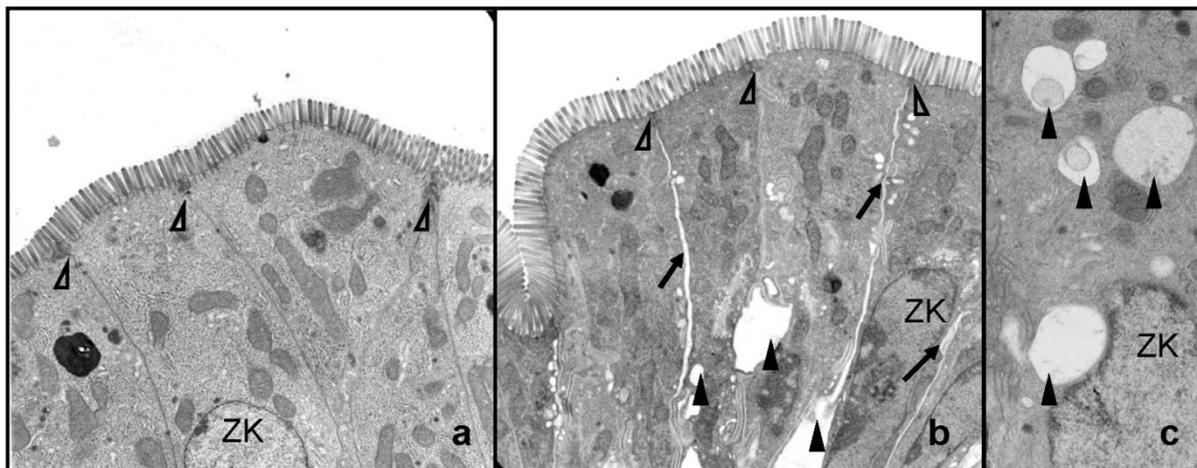


Abbildung 55: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Darmepithels.

a Kontrollgruppe nach 135 min, b HES-Gruppe 130/0,4 nach 135 min. Nach Perfusion mit HES finden sich zahlreiche intrazelluläre Vakuolen (schwarze Pfeilköpfe) und erweiterte interzelluläre Spalten (Pfeile). c Vergrößerter Ausschnitt mit typischen Vakuolen (schwarze Pfeilköpfe) nach der HES-Perfusion. Abbildung a und b bei 5000-facher Vergrößerung, c bei 10000-facher Vergrößerung. Weiße Pfeilköpfe = Tight Junctions, ZK = Zellkern.

3.3.1.9. Analyse der Darmperistaltik

Die Darmmotilität wurde anhand der Videoaufzeichnung zu den Zeitpunkten 60-61 Minuten und 120-121 Minuten bestimmt. Dabei wurde die Anzahl der Kontraktionen eines Dünndarmsegmentes über eine Minute ermittelt.

Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der Darmmotilität nach der Perfusion mit HES 130/0,4 festgestellt werden [60-61 min ($39,00 \pm 2,45$ Kontraktionen $\cdot \text{min}^{-1}$) vs. 120-121 min ($36,50 \pm 1,73$ Kontraktionen $\cdot \text{min}^{-1}$); $p > 0,05$; Abbildung 56]. Ebenso gab es keine signifikanten Veränderungen in der Darmmotilität durch eine HES 130/0,4-Perfusion im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abbildung 31).

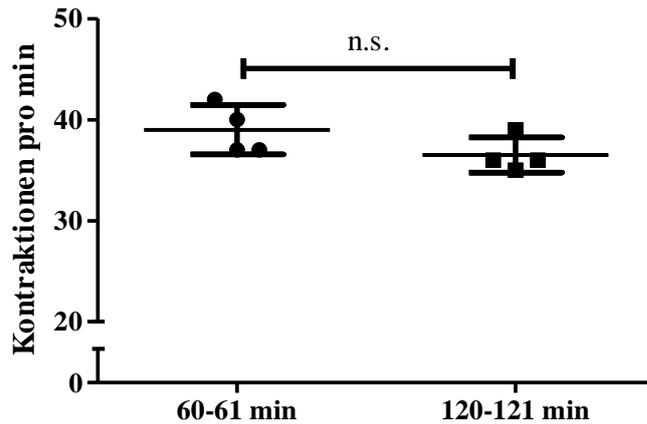


Abbildung 56: Mittlere Darmmotilität mit Wechsel zum HES 130/0,4-Puffer bei Minute 60. Gezeigt wird die Anzahl der Kontraktionen zum Zeitpunkt 60-61 min und 120-121 min mit der Standardabweichung (n=4); t-Test; n.s. = $p > 0,05$.

3.3.1.10. Zusammenfassung (3 % HES 130/0,4)

Die vaskuläre Perfusion mit HES 130/0,4 führte zu signifikanten Veränderungen in der Funktion, Permeabilität und Morphologie des isoliert perfundierten Maudünndarms. Eine Perfusion mit HES 130/0,4 verursachte eine signifikante Erhöhung des intraarteriellen Drucks und der luminalen Flussrate gegenüber den Kontrollbedingungen. Ebenso kam es zu einer signifikanten Permeabilisierung der endo- und epithelialen Barriere mit erhöhtem FITC-Dextran-Transfer aus dem vaskulären Kompartiment ins Interstitium und Darmlumen. Funktionell konnte eine hoch signifikante Reduktion der luminalen Galaktoseaufnahme nach einer HES 130/0,4-Perfusion gezeigt werden. Die EM-Aufnahmen zeigten zudem deutliche morphologische Veränderungen in Form von vermehrter intrazellulärer Vakuolenbildung und erweiterten interzellulären Spalten nach einer HES 130/0,4-Perfusion.

3.3.2. 3 % HES 200/0,5 (Krebs-Henseleit-Puffer) als vaskuläres Perfusat

Zusätzlich zum aktuell eingesetzten HES 130/0,4 wurde ein HES-Präparat aus der vorherigen Generation getestet. Das kommerziell noch erhältliche HES 200/0,5-Präparat wurde im klinischen Einsatz durch das modernere HES 130/0,4 fast vollständig ersetzt. Das Versuchsdesign in der HES 200/0,5-Gruppe war bis auf das eingesetzte Präparat identisch zur HES 130/0,4-Gruppe. Der isolierte Maudünndarm wurde zur Äquilibration die ersten 60 Minuten unter Kontrollbedingungen perfundiert, um Referenzwerte zu erhalten, anhand derer die Validität des Versuchs abgeschätzt werden konnte. Erst nachdem die ermittelten Druck- und Flussdaten den Werten unter Kontrollbedingungen entsprachen, wurde der vaskuläre Puffer auf 3 % HES 200/0,5 gewechselt (siehe 2.1.3) und der BSA-haltige Puffer aus dem Perfusionssystem gespült. Veränderungen die nach dem Pufferwechsel eintraten, konnten somit auf die Perfusion mit HES 200/0,5 zurückgeführt werden.

3.3.2.1. Arterieller und luminaler Gefäßdruck

Der intraarterielle Druck stieg nach der Pufferumstellung auf HES 200/0,5 signifikant an [35-45 min ($38,85 \pm 1,52$ mmHg) vs. 60-75 min ($46,86 \pm 1,84$ mmHg), 75-90 min ($47,36 \pm 1,63$ mmHg), 90-105 min ($46,05 \pm 1,89$ mmHg), 105-120 min ($45,49 \pm 1,61$ mmHg), 120-135 min ($45,06 \pm 1,43$ mmHg); $p < 0,001$; Abbildung 57]. Ein Vergleich der intraarteriellen Druckdaten unter Kontrollbedingungen (Abbildung 19) mit denen unter HES 200/0,5-Perfusion zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ebenso konnten beim intraluminalen Druck keine statistisch signifikanten Unterschiede nach dem Wechsel auf HES 200/0,5 festgestellt werden. Der intraluminale Druck unterschied sich während einer HES 200/0,5-Perfusion nicht signifikant von dem unter Kontrollbedingungen.

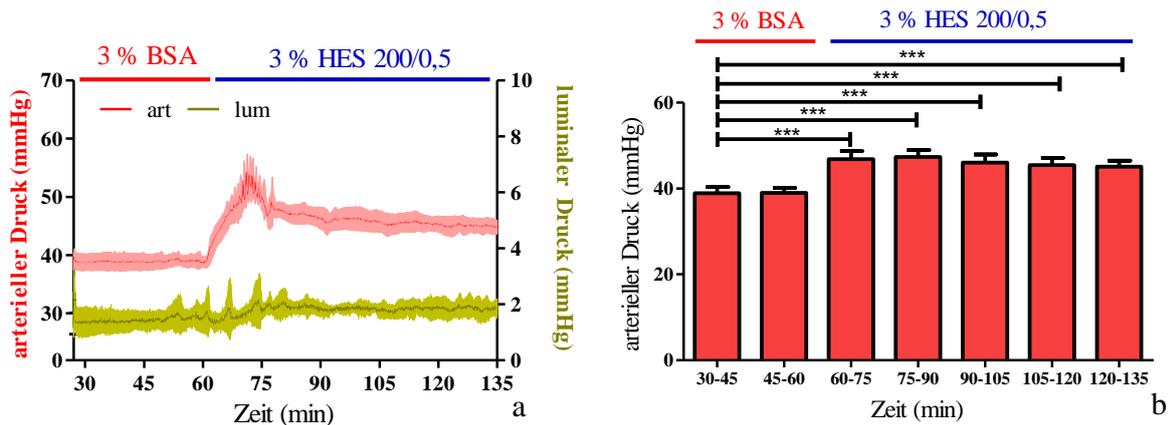


Abbildung 57: Mittlerer intraarterieller und intraluminale Druck mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60.

Gezeigt werden der arterielle (rot, linke Y-Achse) und luminaler Druck (gelb, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung (a). Vergleich des mittleren intraarteriellen Drucks im 15 Minuten Intervall mit der Standardabweichung (b) (n=4); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$.

3.3.2.2. Vaskulärer und lymphatischer Fluss

Nach dem Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 200/0,5 konnte eine signifikante Reduktion der venösen Flussrate beobachtet werden (einfaktorielles ANOVA) [45-60 min ($1,91 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. 120-135 min ($1,8 \pm 0,07 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,05$; Abbildung 58]. Ebenso konnte eine signifikante Zunahme der luminalen Flussrate nach dem Wechsel auf HES 200/0,5 gezeigt werden [30-45 min ($0,056 \pm 0,007 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. 105-120 min ($0,12 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($0,158 \pm 0,035 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,01$]. Die lymphatische Flussrate unterschied sich nach dem Wechsel auf HES 200/0,5 nicht signifikant von der Flussrate vor dem Wechsel. Ein Vergleich der Flussraten unter Kontrollbedingungen (Abbildung 20) mit denen unter HES 200/0,5-Perfusion (zweifaktorielles ANOVA) zeigte eine signifikante Reduktion der venösen Flussrate [Kontrolle 105-120 min ($1,94 \pm 0,05 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. HES 200/0,5 105-120 min ($1,824 \pm 0,05 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,001$] und eine signifikante Erhöhung der luminalen Flussrate [Kontrolle 105-120 min ($0,06 \pm 0,01 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($0,07 \pm 0,01 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) vs. HES 200/0,5 105-120 min ($0,12 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 120-135 min ($0,16 \pm 0,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$); $p < 0,001$] während einer HES 200/0,5 Perfusion.

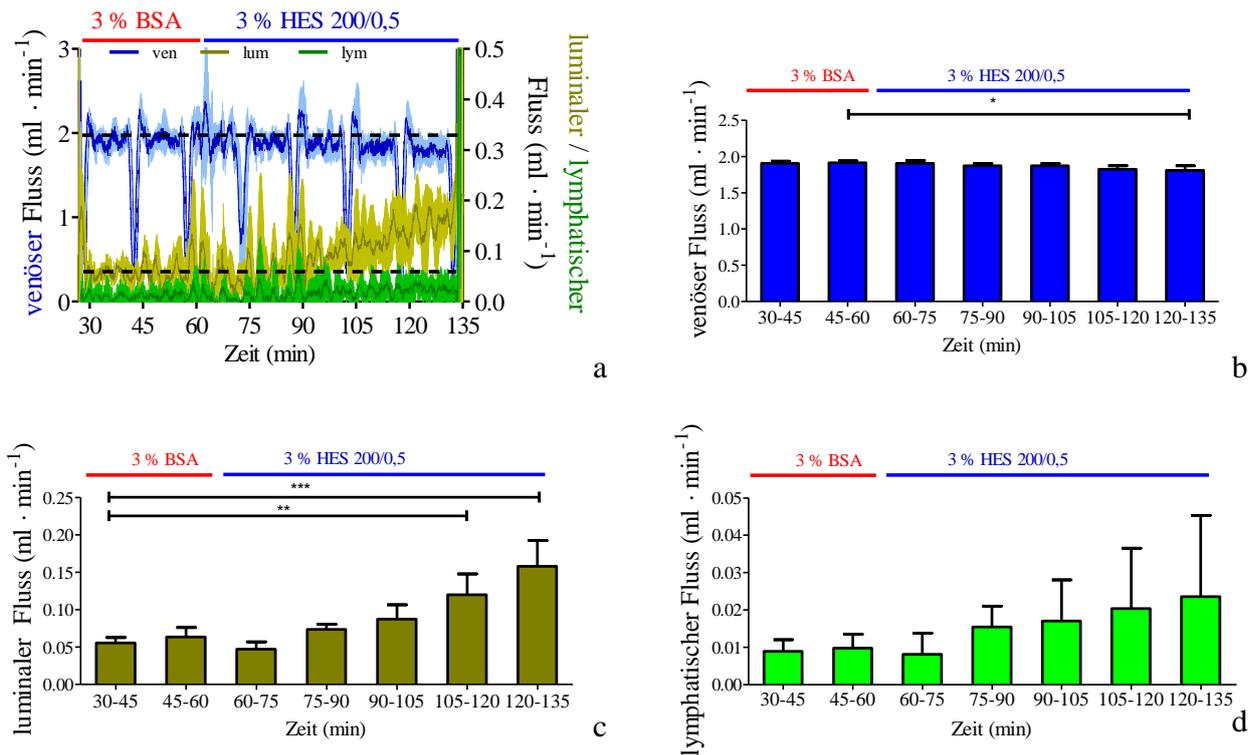


Abbildung 58: Mittlere venöse, luminaler und lymphatischer Flussrate mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60.

Gezeigt werden in a die venösen (blau, linke Y-Achse), luminalen (gelb, rechte Y-Achse) und lymphatischen Flussraten (grün, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung (n=4). Die schwarz gestrichelten Linien markieren die voreingestellte Perfusionsgeschwindigkeit der vaskulären (2 ml/min) und luminalen (0,06 ml/min) Perfusion (Erwartungswerte). Die Flussraten wurden aus den Gewichtsdaten der Effluat berechnet. Die venösen Artefakte in 15-minütigen Abständen wurden durch die Probenentnahmen verursacht und stellen keinen tatsächlichen Abfall der Flussrate dar. In b wird die mittlere venöse Flussrate, in c die mittlere luminaler Flussrate und in d die mittlere lymphatische Flussrate mit der Standardabweichung gezeigt; einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

3.3.2.3. Barrierefunktion

Sowohl im luminalen als auch im lymphatischen Effluat konnten signifikante Unterschiede in der FITC-Dextran-Konzentration nach dem Wechsel auf den HES 200/0,5-Puffer nachgewiesen werden (Abbildung 59). Im luminalen Effluat konnte eine stetige signifikante Erhöhung der FITC-Dextran-Konzentration nach dem Wechsel auf HES 200/0,5 nachgewiesen werden [30 min ($1,25 \pm 1,31 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 45 min ($1 \pm 0,71 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 60 min ($0,65 \pm 0,31 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 75 min ($0,37 \pm 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 90 min ($0,63 \pm 0,19 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. 120 min ($7,23 \pm 2,26 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($12,0 \pm 2,61 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); p < 0,001]. Die lymphatische FITC-Dextran-Konzentration stieg über den Versuchszeitraum signifikant an [30 min ($5,17 \pm 4,81 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. 45 min ($16,03 \pm 0,58 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 60 min ($18,18 \pm 3,67 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 90 min ($21,43 \pm 2,52 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 105 min ($24,28 \pm 2,66 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 120 min ($26,07 \pm 1,79 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($27,65 \pm 3,01 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); p < 0,01]. Im venösen Effluat kam es zu keinen signifikanten Veränderungen in der FITC-Dextran-Konzentration durch die Perfusion mit HES 200/0,5. Im

Vergleich zu den Daten unter Kontrollbedingungen (Abbildung 21) konnten signifikant höhere FITC-Dextran-Konzentrationen im luminalen Effluat während der HES 200/0,5 Perfusion gefunden werden [Kontrolle 105 min ($0,49 \pm 0,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 120 min ($0,47 \pm 0,27 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($0,6 \pm 0,37 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) vs. HES 200/0,5 105 min ($2,83 \pm 1,08 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 120 min ($7,23 \pm 2,26 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 135 min ($12,0 \pm 2,61 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); $p < 0,001$]. Die venösen und lymphatischen FITC-Dextran-Konzentrationen mit der HES 200/0,5-Perfusion unterschieden sich nicht signifikant von denen unter Kontrollbedingungen.

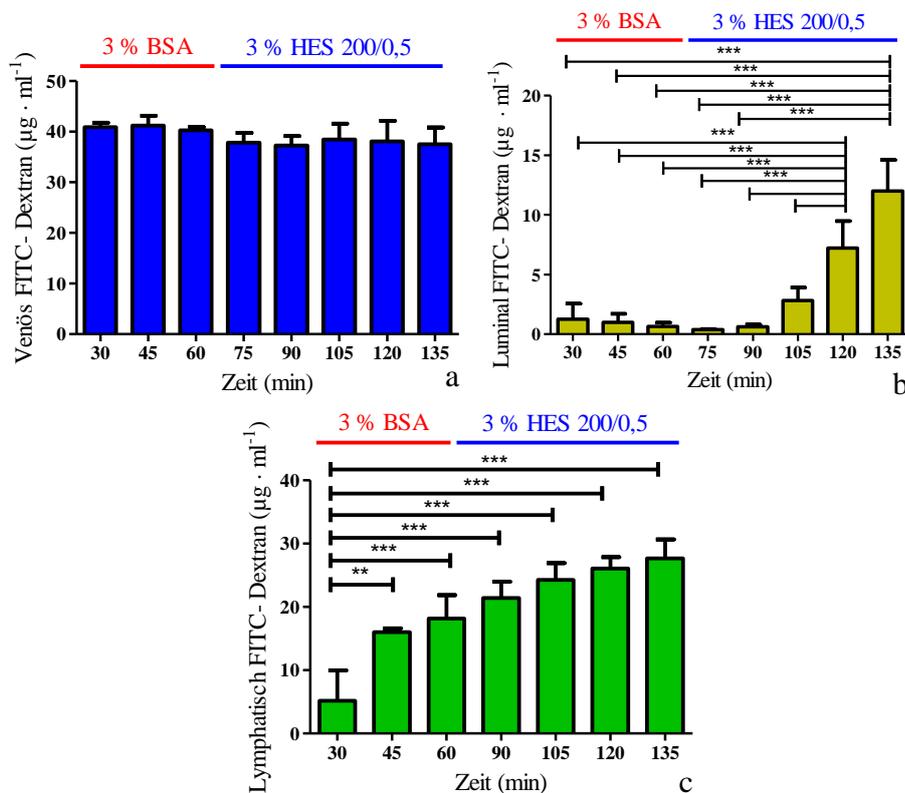


Abbildung 59: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60.

Dargestellt sind die mittleren FITC-Dextran-Konzentrationen im venösen (a, blau) luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Kompartiment mit der Standardabweichung ($n=4$); einfaktorielles ANOVA (Bonferroni Post-Test); ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Um Veränderungen in der Permeabilität registrieren zu können, wurde die in 15 Minuten Intervallen transferierte FITC-Dextran-Menge in den verschiedenen Effluaten quantifiziert.

Beim FITC-Dextran-Transfer gab es im venösen und lymphatischen Effluat keine signifikanten Veränderungen nach der Umstellung des vaskulären Puffers auf HES 200/0,5 (Abbildung 60). Der luminal FITC-Dextran-Transfer stieg nach dem Wechsel auf HES 200/0,5 signifikant an [45 min ($0,786 \pm 0,488 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 60 min ($0,601 \pm 0,285 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 75 min ($0,257 \pm 0,056 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($0,699 \pm 0,266 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 105 min

($3,89 \pm 2,04 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. 135 min ($29,46 \pm 13,3 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,001$]. Der Vergleich zwischen Kontrollbedingungen (Abbildung 22) und der HES 200/0,5-Perfusion (zweifaktorielle ANOVA) zeigte eine signifikante Reduktion des venösen (Kontrolle 75 min ($1195 \pm 50,87 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($1156 \pm 32,99 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($1162 \pm 50,33 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($1126 \pm 39,07 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. HES 200/0,5 75 min ($1080 \pm 53,5 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 90 min ($1048 \pm 61,2 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 120 min ($1040 \pm 101,3 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($1018 \pm 68,5 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,05$) und einen signifikanten Anstieg des luminalen FITC-Dextran-Transfers (Kontrolle 120 min ($0,45 \pm 0,27 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($0,6 \pm 0,37 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$) vs. HES 120 min ($13,71 \pm 7,1 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$), 135 min ($29,46 \pm 13,3 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$); $p < 0,001$). Der lymphatische FITC-Dextran-Transfer unterschied sich unter der HES 200/0,5-Perfusion nicht von dem unter Kontrollbedingungen.

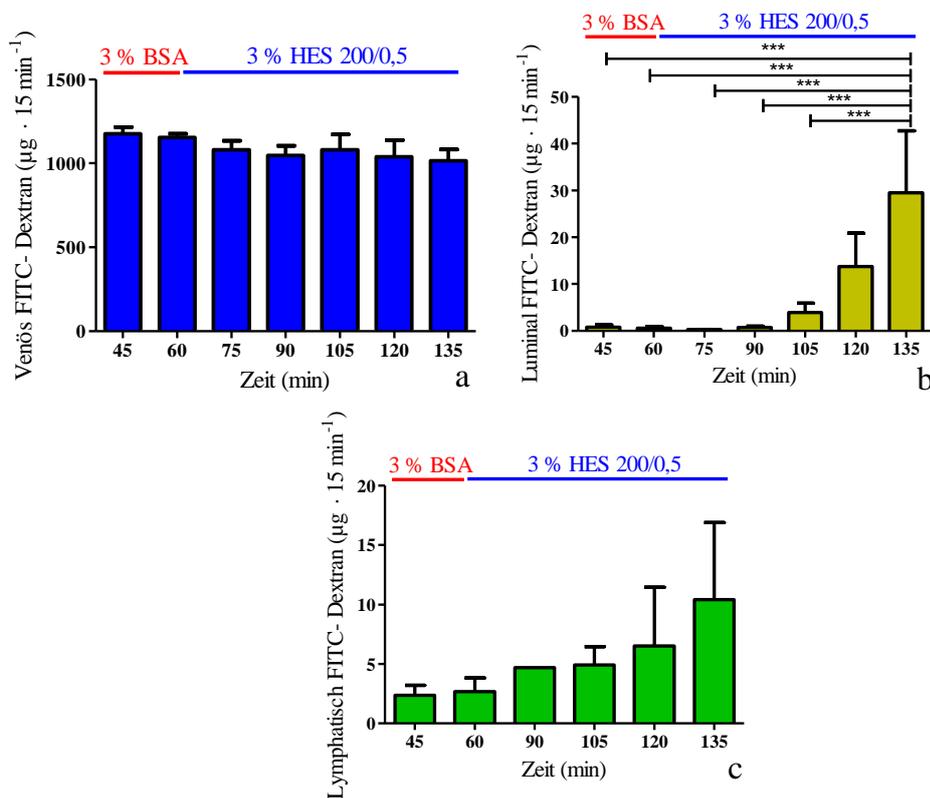


Abbildung 60: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen in den Effluaten mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer nach Minute 60.

Gezeigt wird der FITC-Dextran-Transfer mit der Standardabweichung im venösen (a, blau), luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Effluat. Dies wurde aus den Gewichtsdaten und FITC-Dextran-Konzentrationen im 15 Minuten Intervall berechnet ($n=4$); einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$.

3.3.2.4. Gewichtsveränderung des Darms während der Perfusion

Um mögliche Flüssigkeitseinlagerungen des Dünndarms nach dem Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 200/0,5 registrieren zu können, wurde das Gewicht des isolierten

Mausdünnarms kontinuierlich über eine in die Kammer integrierte Waage bestimmt. Nach einer anfänglichen signifikanten Gewichtszunahme des Dünndarms bis Minute 75 blieb das Gewicht im weiteren Versuchsverlauf konstant (Abbildung 61) [30-45 min ($130 \pm 55,8$ mg), 45-60 min ($305,3 \pm 69,78$ mg), 60-75 min ($718,2 \pm 202,5$ mg) vs. 120-135 min ($900,8 \pm 272,2$ mg); $p < 0,05$]. Der Vergleich des Darmgewichts unter Kontrollbedingungen (Abbildung 23) mit der HES 200/0,5-Perfusion (zweifaktorielle ANOVA) ergab ein signifikant höheres Darmgewicht im Zeitintervall 105-120 min [Kontrolle 105-120 min ($492,4 \pm 207,2$ mg) vs. HES 200/0,5 105-120 min ($766,9 \pm 207,8$ mg); $p < 0,05$] bei der HES 200/0,5-Perfusion.

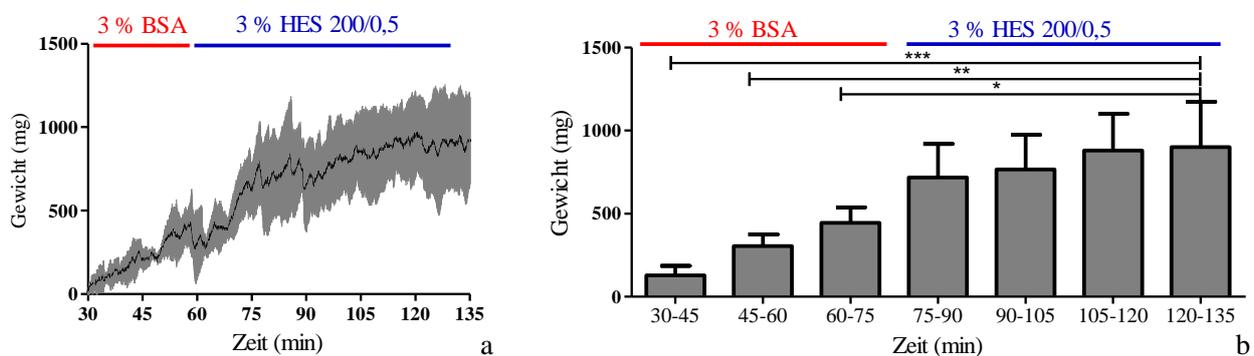


Abbildung 61: Mittlere Gewichtszunahme des Darm mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60. Dargestellt wird die mittlere Gewichtszunahme des Darms mit der Standardabweichung (a) und die mittlere Gewichtszunahme in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (b) (n=4); einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

3.3.2.5. Luminale Galaktoseaufnahme

Die Perfusion mit HES 200/0,5 führte zu einer signifikanten Verringerung der luminalen Galaktoseaufnahme des Dünndarms [30 min ($0,368 \pm 0,078$ mg · min⁻¹ · g⁻¹) vs. 90 min ($0,175 \pm 0,039$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 105 min ($0,092 \pm 0,03$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 120 min ($0,054 \pm 0,032$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 135 min ($0,034 \pm 0,028$ mg · min⁻¹ · g⁻¹); $p < 0,001$; Abbildung 62]. Der Vergleich zwischen Kontrollbedingungen und der HES 200/0,5-Perfusion (zweifaktorielle ANOVA) zeigte einen signifikanten Rückgang der Galaktoseaufnahme in der HES 200/0,5-Gruppe (Kontrolle 105 min ($0,281 \pm 0,075$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 120 min ($0,263 \pm 0,082$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 135 min ($0,259 \pm 0,107$ mg · min⁻¹ · g⁻¹) vs. HES 200/0,5 105 min ($0,092 \pm 0,03$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 120 min ($0,054 \pm 0,032$ mg · min⁻¹ · g⁻¹), 135 min ($0,034 \pm 0,028$ mg · min⁻¹ · g⁻¹); $p < 0,001$).

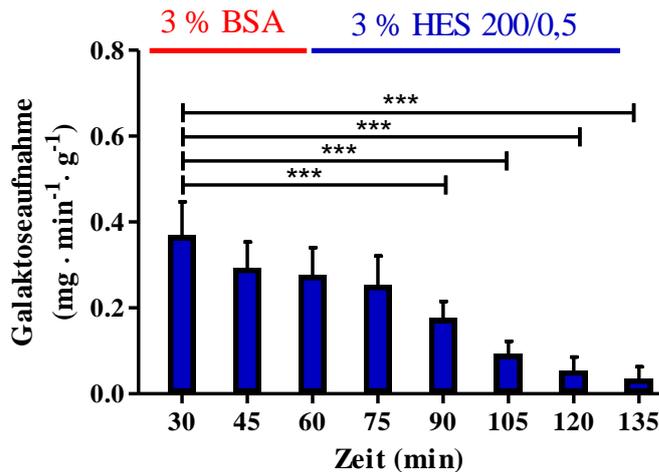


Abbildung 62: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60.

Dargestellt ist die mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung. Probenentnahme alle 15 Minuten, die Galaktoseaufnahme wurde auf das Trockengewicht normiert (n=4); einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$.

3.3.2.6. Laktat zu Pyruvat Verhältnis, pH-Wert und Sauerstoffaufnahme

Zu Beginn der Perfusion konnten signifikant höhere Laktat zu Pyruvat Verhältnisse als zum Versuchsende ermittelt werden [30 min ($25,3 \pm 1,6$) vs. 60 min ($16,4 \pm 2,1$), 75 min ($14,6 \pm 0,5$), 90 min ($11,54 \pm 0,94$), 105 min ($10,1 \pm 1,2$), 120 min ($9,1 \pm 0,9$), 135 min ($8,54 \pm 1,05$); $p < 0,01$]. Ab Minute 75 war kein signifikanter Abfall im Laktat zu Pyruvat Verhältnis nachweisbar (Abbildung 63). Der Vergleich zwischen den Versuchen unter Kontrollbedingungen gegen die HES 200/0,5-Perfusion (zweifaktorielle ANOVA) ergab ein signifikant höheres Laktat zu Pyruvat Verhältnis zum Zeitpunkt 75 min [Kontrolle 75 min ($11,1 \pm 1,2$) vs. HES 200/0,5 75 min ($14,6 \pm 0,5$); $p < 0,05$].

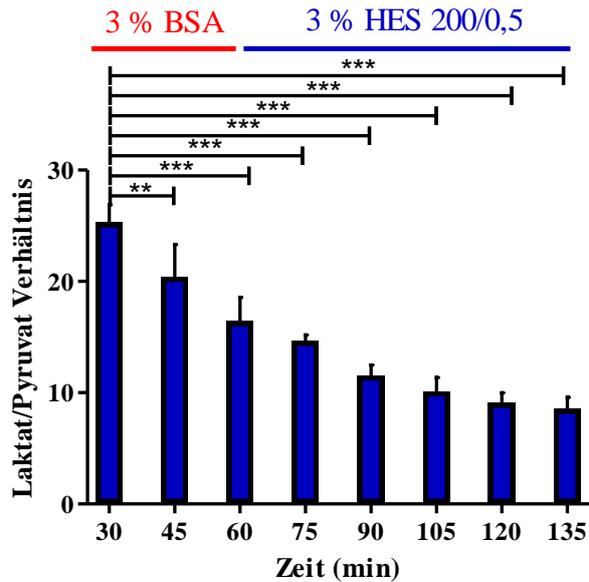


Abbildung 63: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60. Verhältnis berechnet aus venösen Proben in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (n=4); einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$.

Der pH-Wert war bis auf den Zeitpunkt 15 min über den gesamten Versuchszeitraum konstant und unterschied sich nicht von dem unter Kontrollbedingungen (Abbildung 64). Der Wechsel des vaskulären Perfusats auf HES 200/0,5 verursachte keine signifikanten Veränderungen im arteriellen pH-Wert.

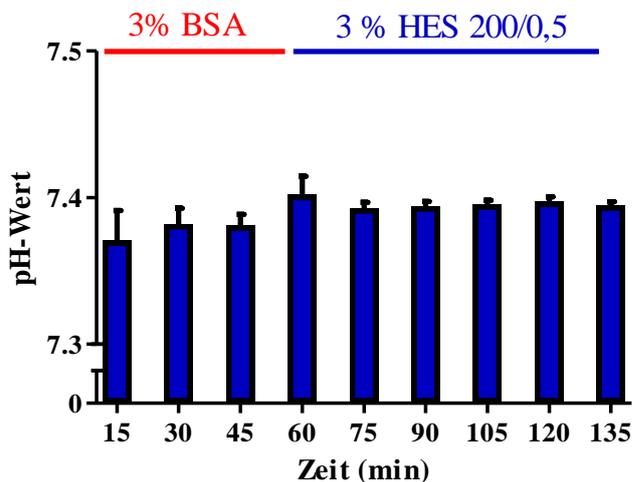


Abbildung 64: Mittlerer arterieller pH-Wert mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung (n=4).

Es kam zu keinen signifikanten Unterschieden in der Sauerstoffaufnahme des Darms nach dem Wechsel auf die HES 200/0,5-Perfusion (Abbildung 65).

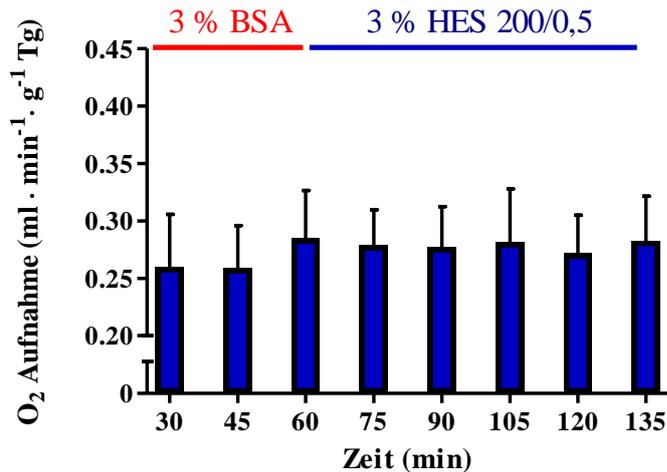


Abbildung 65: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60.

Dargestellt ist die Sauerstoffaufnahme mit der Standardabweichung normiert auf das Trockengewicht des Darms (n=4).

3.3.2.7. Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht

Um Flüssigkeitseinlagerungen im Dünndarmgewebe nach der Perfusion ermitteln zu können, wurde das Feucht- zu Trockengewicht des Darms vor und nach der Perfusion bestimmt. Beim Verhältnis des Feucht- zu Trockengewichts konnte nach der Perfusion mit HES 200/0,5 keine signifikante Veränderung gegenüber einer Perfusion unter Kontrollbedingungen festgestellt werden (Abbildung 66) [Kontrolle W/d 2 ($5,44 \pm 0,19$) vs. HES 200/0,5 W/d 2 ($5,76 \pm 0,33$); $p > 0,05$]. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen dem Gewebe vor und nach der HES 200/0,5-Perfusion ermittelt werden [W/d 1 ($4,49 \pm 0,11$) vs. W/d 2 ($5,76 \pm 0,33$); $p < 0,05$].

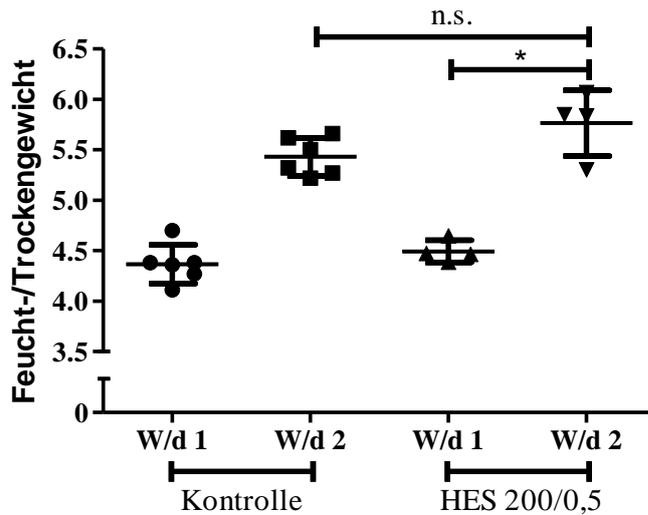


Abbildung 66: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms unter Kontrollbedingungen und mit HES 200/0,5-Puffer.

Dargestellt werden die Mittelwerte mit der Standardabweichung, W/d 1 = Probe vor Perfusion, W/d 2 = Probe nach Perfusion. Die Anzahl der Replikate unter Kontrollbedingungen betragen $n=6$ und mit HES 200/0,5 $n=4$; t-Test; n.s. = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$.

3.3.2.8. Histomorphologische Auswertung

Der mittlere Histoscore in der HES 200/0,5-Gruppe war signifikant niedriger als der unter Kontrollbedingungen [Kontrolle ($0,61 \pm 0,09$) vs. HES 200/0,5 ($0,35 \pm 0,1$); $p < 0,001$; Abbildung 67]. Somit konnte unter der HES 200/0,5-Perfusion ein signifikant höherer Anteil an geschädigten Enterozyten nachgewiesen werden.

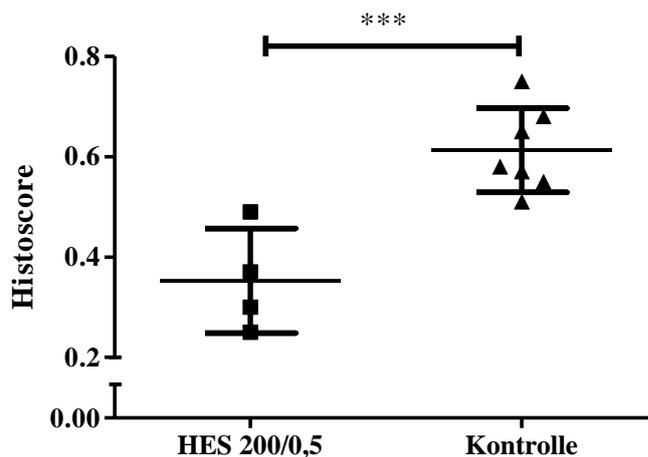


Abbildung 67: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit HES 200/0,5-Puffer.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung in der Kontrollgruppe ($n=7$) und in der HES 200/0,5-Gruppe ($n=4$); t-Test; *** = $p < 0,001$.

3.3.2.9. Analyse der Darmperistaltik

Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der Darmmotilität nach der Perfusion mit HES 200/0,5 festgestellt werden [60-61 min ($37 \pm 2,9$ Kontraktionen \cdot min⁻¹) vs. 120-121 min ($34,5 \pm 2,38$ Kontraktionen \cdot min⁻¹); $p > 0,05$; Abbildung 68]. Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede in der Darmmotilität während der HES 200/0,5-Perfusion im Vergleich zur Perfusion unter Kontrollbedingungen.

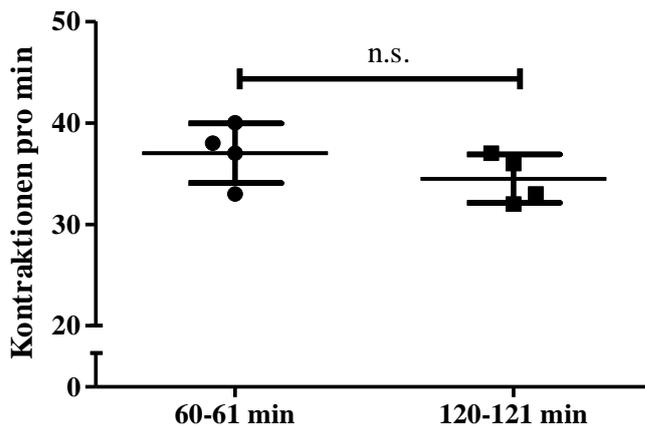


Abbildung 68: Mittlere Darmmotilität mit Wechsel zum HES 200/0,5-Puffer bei Minute 60. Gezeigt wird die Anzahl der Kontraktionen zum Zeitpunkt 60-61 min und 120-121 min mit der Standardabweichung (n=4); t-Test; n.s. = $p > 0,05$.

3.3.2.10. Zusammenfassung (3 % HES 200/0,5)

Die vaskuläre Perfusion mit HES 200/0,5 führte zu ähnlich signifikanten Veränderungen in der Funktion, Permeabilität und Morphologie des Dünndarms wie die Perfusion mit HES 130/0,4. Es kam zum signifikanten intraarteriellen Druckanstieg und einer Reduktion der venösen bzw. Zunahme der luminalen Flussrate. Zudem kam es zu einem signifikant erhöhten FITC-Dextran-Transfer ins lumenale Kompartiment und einer signifikanten Reduktion der luminalen Galaktoseaufnahme durch die HES 200/0,5-Perfusion. Ein Vergleich mit den Versuchen unter Kontrollbedingungen zeigte ein signifikant erhöhtes Darmgewicht im Zeitintervall 105-120 min und ein erhöhtes Laktat- zu Pyruvat Verhältnis zum Zeitpunkt 75 min bei der HES 200/0,5 Perfusion. Im Gegensatz zur HES 130/0,4-Perfusion konnte bei HES 200/0,5 ein signifikant niedrigerer Histoscore nach dem Versuchsende festgestellt werden. Somit konnte eine stärkere Schädigung der Enterozyten durch die HES 200/0,5-Perfusion gezeigt werden.

3.3.3. 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium) als vaskuläres Perfusat

Zusätzlich zu den getesteten 3 %igen HES-Varianten HES 130/0,4 und HES 200/0,5 in Krebs-Henseleit-Puffer wurden alle Untersuchungen auch mit einer 4 % HES 200/0,5-Lösung (siehe 2.1.4) in RPMI 1640-Medium durchgeführt. Dieses vaskuläre Perfusat konnte in der isoliert perfundierten Mauslunge [50] erfolgreich eingesetzt werden. Aufgrund der Eignung des Puffers für die isolierte Mauslunge, wurden im isolierten Maudünndarm die ersten HES Versuche mit 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium) durchgeführt. Erst danach fanden die in 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Versuche statt. Die Perfusion mit 4 % HES 200/0,5-Puffer (RPMI 1640-Medium) begann direkt ohne 60-minütige Equilibrierungsphase.

4 % HES 200/0,5 führten im isolierten Maudünndarm zu einem signifikanten intraarteriellen Druckanstieg und erhöhter luminaler und lymphatischer Flussrate. Ebenso kam es zu einem signifikanten Anstieg der FITC-Dextran-Konzentrationen im luminalen und lymphatischen Effluat mit erhöhtem FITC-Dextran-Transfer vom vaskulären ins lumenale Kompartiment. Die Perfusion mit 4 % HES 200/0,5 verringerte auch die lumenale Galaktoseaufnahme des Darms signifikant. Im Vergleich zu den HES-Perfusaten in Krebs-Henseleit-Puffern kam es beim 4 % HES 200/0,5 in RPMI 1640-Medium zu einem signifikant höheren arteriellen pH-Wert und einer signifikant erhöhten Sauerstoffaufnahme des Dünndarms. Bei Laktat zu Pyruvat Verhältnis, Darmgewicht, Darmmotilität und Histoscore konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen ermittelt werden (Daten siehe Anhang).

4. Diskussion

Die pathophysiologischen Auswirkungen einer HES-Infusion konnten bereits in diversen Organen wie Lunge, Leber, Niere und Herz untersucht werden [33, 51-53]. Eine umfassende Untersuchung von Veränderungen in der intestinalen Barrierefunktion, Flüssigkeitshomöostase, metabolischen Funktion und Histomorphologie, die eine HES-Perfusion auslösen könnte, wurde bisher nicht durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Validierung eines isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells um die intestinale Verträglichkeit von verschiedenen HES-Varianten im Maudünndarm zu untersuchen.

4.1. Modelletablierung

Die Portierung des isoliert perfundierten Rattendünndarm-Modells [29] auf die Maus war ein Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Erst das neu etablierte Maus-Modell ermöglichte die geplanten Untersuchungen der hämodynamischen und funktionellen Veränderungen sowie der Barrierefunktion einer HES-Perfusion im Maudünndarm. Das Maus-Modell erweitert hierbei die Vorteile des Ratten-Modells (1.6.3) um weitere Analysewerkzeuge wie Antikörper, ELISA-Kits und *knock out*-Stämmen für die Maus.

4.1.1. Narkose

Die anfängliche hohe Mortalitätsrate war bei der Mausnarkose ein Problem, da die Versuchstiere bei einer leichten Sevofluran-Überdosierung schnell in eine Atemdepression gerieten. Ebenso führte eine Ketamin-Dosierung, die normalerweise als Injektionsnarkose in Kombination mit Xylanzine empfohlen wird [54], bei einer Kombination mit Sevofluran zum Tod der Tiere. Allgemein werden Inhalationsanästhetika für die Narkose von Nagetieren nicht empfohlen, da eine präzise Dosierung über Verdampfer notwendig ist [54]. Für die Sevofluran/Ketamin-Narkose konnte eine optimale Dosis gefunden werden. Diese Kombinationsnarkose wurde im Ratten-Modell ebenfalls erfolgreich eingesetzt [29]. Damit wurde eine Narkose mit stabiler Spontanatmung im Bereich der natürlichen Atemfrequenz [55] aufrecht erhalten.

4.1.2. Präparation

Eine Verbesserung in der Präparation konnte mit den in Kooperation mit HSE-Elektronik hergestellten, verkleinerten und gebogenen Kanülen erzielt werden. Die Kanülierung der Vene und Aorta in der Maus wurde deutlich erleichtert und die „Ausklemmzeit“, in der die Aorta für die Dauer der Kanülierung mit einer Gefäßzange geschlossen wurde, konnte um bis zu 50 % verkürzt werden. Dennoch war diese Prozedur aufgrund der Größe des Operationsfeldes an der Grenze der Durchführbarkeit. Eine erfolgreiche Präparation konnte selbst ein routinierter Präparator nur in 70-80 % der Fälle erreichen und dauerte zwischen 65-90 Minuten. Im Vergleich dazu wird für die Präparation des Rattendünndarms weniger als 60 Minuten bei höherer Erfolgsrate benötigt (eigene Vorversuche). Somit war die Präparation des Maudünndarms deutlich zeitaufwendiger und technisch anspruchsvoller als die des Rattendünndarms, aber dennoch durchführbar.

Nach der Kanülierung wurde der isolierte Dünndarm mit der neu konstruierten Transporthilfe in die Kammer übertragen. Die Ausfälle konnten in diesem Schritt minimiert werden, so dass ein dichter und intakter Maudünndarm in knapp 60-75 % der Fälle vorlag. Die „Dichtigkeit“ wurde hierbei über die Menge des abgeführten lymphatischen Effluats und ihrer FITC-Dextran-Konzentration definiert. Diese Effluat-Menge lag in vaskulär dichten Präparationen in einem Größenbereich von 0,8-2 ml/h mit einer FITC-Dextran-Konzentration zwischen 20-30 mg/l und somit unterhalb der vaskulär applizierten 40 mg/l. *In vivo* Untersuchungen bei Mäusen zeigten am *Ductus thoracicus*, welcher fast die gesamte Lymphe des Körpers sammelt, einen physiologischen Lymphfluss von 1,16-1,25 ml/h [56, 57]. Die im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell erreichte lymphatische Flussrate war zwar höher, befand sich aber in einem physiologisch vergleichbaren Bereich [56, 57].

Zur Messung der geringfügigen Änderungen in Flussrate und Darmgewicht des Maudünndarms wurden hochauflösende Waagen eingesetzt. Die fraktionierte Probenentnahme in geöffneten 15 ml Schraubdeckelröhren stellte vor allem beim lymphatischen Effluat ein Problem dar, da teilweise nicht genügend Probenvolumen für die FITC-Dextran-Analyse zur Verfügung stand. Aufgrund der langen Standzeit (< 120 min) kam es zusätzlich zu einer Verdunstung von bis zu 10 % der Proben. Ein Verschließen der Probenröhrchen war während der kontinuierlichen Messung versuchsbedingt nicht möglich. Daher kann von einer bis zu 10 %igen Abweichung bei der Gewichtsbestimmung der Effluat- und der FITC-Dextran-Messung ausgegangen werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch im isoliert perfundierten Rattendünndarm-Modell gemacht werden [29], da dieselbe Methode eingesetzt wurde. Jedoch waren die Effluat-Mengen im Rattenmodell sowohl im

lymphatischen als auch im luminalen Kompartiment deutlich höher. Somit konnte zumindest ein ausreichendes Probenvolumen für die FITC-Dextran-Messung sichergestellt werden. Eine verbesserte Proben-Sammlung ohne Verdunstungsverluste könnte die Genauigkeit der FITC-Dextran-Analyse erhöhen und die Untersuchungen zur Flüssigkeitshomöostase optimieren.

4.1.3. Perfusionsparameter

Neben der Modifikation und Optimierung in der Narkoseführung, der Präparationstechnik und der technischen Anlage war eine Anpassung der physikalischen Perfusionsparameter an die Mausphysiologie notwendig. Die vaskuläre Perfusionsrate wurde nach den Ergebnissen aus den Vorversuchen auf 2 ml/min festgelegt. Diese Flussrate entsprach, umgerechnet auf das Gewicht des perfundierten Organs, den in der Literatur gefundenen *in vivo* Flussraten für den Dünndarm und Gastrointestinaltrakt der Maus ($0,8-2,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Organgewicht) [42, 43, 45, 46].

Der intraarterielle Gefäßdruck ist ein wichtiger Parameter zur Überwachung des kardiovaskulären Systems. Der durch die vaskuläre Perfusion erzeugte intraarterielle Druck lag im isoliert perfundierten Maudünndarm deutlich niedriger als der physiologisch erreichte arterielle Druck *in vivo* [48]. Dieser Aspekt wurde auch in anderen Untersuchungen gezeigt [29, 49]. Ein Faktor für diese Abweichungen im arteriellen Druck liegt im Unterschied zwischen der Zusammensetzung des Bluts und der Perfusionslösungen. In der vaskulären Perfusionslösung fehlen, neben den korpuskulären Bestandteilen, auch ein Teil der Proteine des Bluts *in vivo*. Die zur Einstellung des kolloidosmotischen Drucks des vaskulären Perfusats eingesetzte BSA-Konzentration lag deutlich unterhalb der physiologischen Albuminkonzentration im Mausblut [58].

Die Höhe der luminalen Perfusionsrate für den isolierten Maudünndarm orientierte sich an dem Rattendünndarm-Modell [29]. Die im Rattendünndarm eingesetzte Perfusionsrate wurde an das geringere Gewicht des isolierten Maudünndarms angeglichen. Eine niedrigere Flussrate wurde vermieden, um eine kontinuierliche lumenale Probenentnahme zu ermöglichen und Darmverschlüsse durch Mukus-Akkumulation zu verhindern. Die physiologische Transportgeschwindigkeit für Nahrungsbrei im Maudünndarm liegt bei 3,2 cm/min [59], die Transportgeschwindigkeit einer Flüssigkeit wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ausgehend von dieser Geschwindigkeit würde der luminal applizierte Nahrungsbrei den ca. 15 cm langen isolierten Maudarm nach ca. 5 Minuten verlassen. Durch Untersuchungen mit luminalen Bolusgaben konnte das lumenale Volumen von 15 cm isoliertem Maudünndarm auf 0,2-0,4 ml eingegrenzt werden. Somit benötigte das lumenale

Perfusat bei der eingestellten Perfusionsrate (0,06 ml/min) ca. 5 Minuten für die Passage des isolierten Maudünndarms und unterschied sich folglich nicht von der im Maudünndarm physiologisch geleisteten Transportrate. Diverse *in vivo* Studien nutzen höhere luminale Perfusionsraten, die zwischen 0,13-0,25 ml/min variieren [26, 44, 60]. Eine Veränderung der luminalen Perfusionsraten kann somit je nach Untersuchungsschwerpunkt durchgeführt werden.

4.1.4. Sauerstoffaufnahme

Neben dem Perfusionsdruck war der Sauerstofftransport über das vaskuläre Perfusat bedeutend. Da der Puffer keine Transportmoleküle für Sauerstoff besaß, konnte dem Dünndarm nur der physikalisch gelöste Anteil an Sauerstoff zugeführt werden. Durch die Oxygenierung des Puffers mit Carbogen konnte der O₂-Partialdruck des arteriellen Perfusats erhöht werden, womit dem perfundierten Organ bei einer Perfusionsrate von 2 ml/min eine berechnete Menge von maximal 0,026-0,028 ml · min⁻¹ Sauerstoff zur Verfügung gestellt werden konnte. Da im abfließenden venösen Effluat ein höherer O₂-Partialdruck als in der Umgebungsluft gemessen wurde, kann von einer ausreichenden Versorgung des Organs durch die Perfusion ausgegangen werden. Untersuchungen anderer Autoren zeigten bei Mäusen eine allgemeine O₂-Aufnahme von 0,02-0,026 ml · min⁻¹ · g⁻¹ Körpergewicht (0,087- 0,114 ml · min⁻¹ · g⁻¹ Trockengewicht) [46, 61]. Andere *in vitro* Messungen mit Gewebestücken aus dem Maudünndarm ergaben einen Sauerstoffverbrauch zwischen 0,014-0,015 ml · min⁻¹ · g⁻¹ Feuchtgewicht (0,064 ml · min⁻¹ · g⁻¹ Trockengewicht) [62]. Da der erwartete O₂-Verbrauch niedriger war als die im Maus-Modell zugeführte O₂-Menge, konnte von einer suffizienten Versorgung des isoliert perfundierten Maudünndarms ausgegangen werden.

4.1.5. Galaktoseaufnahme

Neben dem Sauerstofftransport, war auch die Galaktoseaufnahme des isoliert perfundierten Maudünndarms ein wichtiger funktioneller Parameter für die Wahl der optimalen vaskulären Perfusionsrate. Aus den Vorversuchen konnte bei sinkender Perfusionsrate eine starke Reduktion der im venösen Effluat gemessenen Galaktose-Konzentration registriert werden. Diese Abnahme in der intestinalen Galaktoseaufnahme wies auf eine metabolische Funktionsstörung des isoliert perfundierten Dünndarms hin, da der sekundär-aktive Transport von Galaktose und Glukose aus dem Darmlumen in die Epithelzellen über den natriumgekoppelten Glukosetransporter (SGLT-1, Symporter) vermittelt wird [63]. Mit einer

höheren vaskulären Perfusionsrate konnte der Abfall in der Galaktoseaufnahme signifikant verringert und konstanter gehalten werden als bei niedrigeren Perfusionsraten. Diese Reduktion in der Galaktoseaufnahme konnte auch im isoliert perfundierten Rattendünndarm-Modell [29] gezeigt werden.

4.1.6. Vaskuläre Perfusionslösung

Neben den physikalischen Perfusionsparametern, wurde in Vorversuchen die vaskuläre Pufferzusammensetzung modifiziert und dem Mausblut angepasst. Ein an die Maus angepasstes vaskuläres Perfusat mit höherer Ca^{2+} -, Glukose- und Albumin-Konzentration [58] führte zu keinen Veränderungen in Perfusionsdruck, Barrierefunktion, Galaktoseaufnahme, Flüssigkeitshomöostase und Histomorphologie. Abgesehen von den erhöhten Ca^{2+} - und Glukose-Konzentrationen gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Elektrolyte und der Osmolarität zwischen Maus- und Rattenblut [64, 65]. Deshalb wurde für die Perfusion die Zusammensetzung des vaskulären Perfusats aus dem Rattendünndarm-Modell [29] übernommen.

4.2. Modellvalidierung

4.2.1. Perfusion unter Kontrollbedingungen

Die Daten aus den Versuchen unter Kontrollbedingungen deuteten auf einen metabolisch aktiven, isoliert perfundierten Maudünndarm mit intakter Barrierefunktion und Flüssigkeits-Homöostase hin.

Die eingestellte vaskuläre und luminale Perfusionsrate führte zu Versuchen mit reproduzierbaren intraarteriellen und intraluminalen Drücken. Der mittlere intraarterielle Druck in der Kontrollgruppe blieb konstant und lag deutlich unterhalb des physiologischen mittleren arteriellen Drucks [48]. Bei einer luminalen Perfusionsrate von 0,06 ml/min war der intraluminale Druck im perfundierten Maudünndarm vergleichbar hoch wie *in vivo* im Rattendünndarm [66]. Die im Maus-Modell ermittelten intraarteriellen und intraluminalen Gefäßdrücke waren vergleichbar mit denen im Rattendünndarm-Modell [29].

Unter Kontrollbedingungen konnte eine stabile venöse und luminale Flussrate gezeigt werden. Ein geringer Anteil aus diesen beiden Fraktionen trat als lymphatisches Effluat aus den zuvor bei der Präparation punktierten Lymphgefäßen aus. Es kam zu keinen unphysiologischen

Flüssigkeitsverschiebungen zwischen dem vaskulären und interstitiellen Kompartiment sowie dem Darmlumen.

Die Stabilität der Barriere unter Kontrollbedingungen konnte durch eine Analyse der FITC-Dextran-Konzentrationen in den Effluaten bzw. des FITC-Dextran-Transfers gezeigt werden. Die FITC-Dextran-Konzentration blieb sowohl im venösen als auch im luminalen Effluat über die gesamte Versuchsdauer konstant. Die lymphatische FITC-Dextran-Konzentration stieg anfänglich und blieb danach konstant bei ca. 50 % der vaskulär eingestellten Konzentration. Es konnte somit im Maus-Modell gezeigt werden, dass ca. 50 % des FITC-Dextrans aus dem vaskulären Kompartiment ins Interstitium übertrat und lymphatisch abfloss. Ein Transfer von vaskulär appliziertem FITC-Dextran ins lumenale Effluat konnte im Maus-Modell nicht gezeigt werden. Dies war auch nicht zu erwarten, da unter physiologischen Bedingungen sowohl das Endothel als auch das Darmepithel eine Barriere für das FITC-Dextran darstellt. Für das Endothel konnte unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden, dass es für FITC-Dextran (150 kDa) fast impermeabel ist [67]. Umgekehrt scheint das Darmepithel und Endothel ebenfalls für luminal appliziertes TRITC-Dextran impermeabel zu sein. In Zusammenarbeit mit der Forschergruppe Mukosale Immunologie und Diagnostik am Forschungszentrum Borstel wurden Versuche zur luminalen Permeabilität von TRITC-Dextran (4,4 kDa) durchgeführt. Das luminal applizierte TRITC-Dextran konnte das Darmepithel nur in geringen Mengen überwinden, und fand sich nur zu ≤ 1 % im venösen und < 1 % im lymphatischen Kompartiment wieder (Daten nicht veröffentlicht). Diese Ergebnisse belegten die intakte Barrierefunktion des Endo- und des Epithels unter Kontrollbedingungen. Die Gewichtsdaten des isoliert perfundierten Maudünndarms zeigten eine stetige Zunahme des Darmgewichts bis Minute 60. Unregelmäßig traten Schübe mit stärkeren oder schwächeren Kontraktionen auf, die sich auf die Darmmotilität und den Gewichtsverlauf kurzfristig auswirkten. Die Darmmotilität war zu jedem Zeitpunkt im Versuch vorhanden und zeigte bis auf die kurzen Aktivitätsspitzen ein gleichmäßiges Bild. Diese Aktivitätsspitzen waren nur von kurzer Dauer und verursachten keine signifikanten Veränderungen in der mittleren Darmmotilität in den überwachten Zeiträumen. Ein Vergleich mit dem Ratten-Modell zeigte ähnliche Befunde. Dort kam es anfänglich ebenfalls zu größeren Gewichtsveränderungen mit höherer Amplitude, die im weiteren Versuchsverlauf nachließen [29].

Um die Funktionsfähigkeit des isoliert perfundierten Maudünndarms zu überprüfen, wurde die luminal Galaktoseaufnahme als exemplarischer Parameter über den Versuchszeitraum bestimmt. Im Maus-Modell zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Galaktoseaufnahme wie im

etablierten Ratten-Modell [29]. In beiden Modellen konnte zum Perfusionsbeginn die höchste Galaktoseaufnahme gemessen werden, die mit zunehmender Perfusionsdauer langsam abfiel. Auffällig war die große individuelle Varianz in der Galaktoseaufnahme, welche möglicherweise von der Verdauungsphase des Tieres zum jeweiligen Präparationszeitpunkt abhing. Die intestinale Galaktoseaufnahme des isoliert perfundierten Maudünndarms entsprach der des isoliert perfundierten Rattendünndarms (genormt auf das Trockengewicht). Um eine stabile Perfusion mit konstanten Bedingungen zu gewährleisten, wurden regelmäßige Messungen der arteriellen und venösen Proben mit einem Blutgasanalysator vorgenommen. Hierbei wurden die Parameter pH-Wert, O_2 -Partialdruck und Laktat-Konzentration bestimmt, da diese Informationen zur Berechnung der Sauerstoffaufnahme benötigt werden und Rückschlüsse auf den Oxygenierungs-Status ermöglichen. Das vaskuläre Perfusat hatte über die Versuchsdauer einen konstanten pH-Wert, der nahe am physiologischen pH-Wert des Mausbluts *in vivo* lag [68].

Wie im isoliert perfundierten Rattendünndarm [29] wurde auch im Maus-Modell auf einen natürlichen oder synthetischen Sauerstoffträger verzichtet, da der Umgang mit Blutkonserven oder Perfluorocarbon das Modell aufwändiger und teurer gemacht hätte. Zudem konnte durch die Oxygenierung mit Carbogen-Gas ein hoher O_2 -Partialdruck im vaskulären Perfusat erreicht werden, der ausreichte um den isolierten Dünndarm suffizient mit Sauerstoff zu versorgen. Der in der Kontrollgruppe ermittelte mittlere O_2 -Verbrauch lag sehr viel höher als die in der Literatur für die Maus angegebenen Werte [46, 61, 62]. Ein tatsächlich höherer O_2 -Bedarf des isoliert perfundierten Maudünndarms kann den Unterschied zwischen der ermittelten O_2 -Aufnahme und den Angaben aus der Literatur alleine nicht erklären. Wahrscheinlich entstand die Differenz zwischen dem gemessenen arteriellen und venösen O_2 -Partialdruck nicht nur durch den O_2 -Verbrauch des perfundierten Dünndarms, sondern zusätzlich durch die Diffusion des Sauerstoffs aus den nicht gasdichten Silikonschläuchen an die Umgebungsluft. Eigene Messungen zeigten selbst bei gasdichten Tygon-Schläuchen (Ismatec, Glattbrugg, Deutschland) einen Verlust von bis zu 30 mmHg O_2 -Partialdruck nach ca. 10 cm Strecke (Daten nicht gezeigt). Durch die geringe Perfusionsgeschwindigkeit verlängerte sich die Dauer der Probenentnahme für die BGA, wo ein Teil des Sauerstoffs im übersättigten venösen Effluat an die Umgebungsluft abgegeben wurde. Bedingt durch den Versuchsaufbau konnte eine venöse Probenentnahme mit geringerem O_2 -Verlust nicht realisiert werden. Entspräche die berechnete O_2 -Aufnahme dem tatsächlichen Bedarf des isoliert perfundierten Maudünndarms, wäre die O_2 -Transportkapazität des vaskulären Puffers bei einer Perfusionsrate von 2 ml/min erschöpft. In diesem Fall könnte eine

Minderversorgung des Dünndarms mit Sauerstoff nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde das Laktat zu Pyruvat Verhältnis im Perfusionszeitraum neben der O₂-Aufnahme als Indikator für auftretende Hypoxie im perfundierten Dünndarm bestimmt. Bei akuter Gewebhypoxie, wie z.B. in Schocksituationen, kann das Laktat zu Pyruvat Verhältnis zur Beurteilung der Störung des Energiestoffwechsels herangezogen werden. Dieses spiegelt das intrazelluläre Redoxgleichgewicht zwischen NADH/NAD⁺ wider und liegt unter physiologischen Bedingungen zwischen 10-20:1 [69].

Das L/P-Verhältnis war kurz nach Beginn der Perfusion am höchsten ($17,3 \pm 4,9$) und fiel danach stetig bis zu einem L/P-Verhältnis von $9,1 \pm 2,5$. Bei *in vivo* Untersuchungen mit körperlich aktiven Mäusen wurde ein L/P-Verhältnis ohne Belastung bei $8 \pm 0,8$ und mit leichter Belastung bei $17,7 \pm 3,3$ bestimmt [70]. Somit konnte aufgrund des L/P-Verhältnisses zumindest für die zweite Hälfte der Versuchsdauer von keiner Hypoxie im perfundierten Dünndarm ausgegangen werden. Ein zum Perfusionsbeginn höheres L/P-Verhältnis konnte auch im Ratten-Modell festgestellt werden. Auch in diesem Fall verringerte sich der Wert im Laufe des Versuchs [29].

Um die Stärke der Ödembildung durch die Perfusion oder der „Intervention“ mit PAF oder HES untersuchen zu können, wurde das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Dünndarms vor und nach der Perfusion bestimmt. Abhängig von der Veränderung des Feucht- zu Trockengewichts nach einer Manipulation, kann die Stärke der Ödembildung im Gewebe eingeschätzt werden [25, 71]. Das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht im Maudünndarm war nach der Präparation am niedrigsten und erhöhte sich nach der Perfusion. Diese signifikante Erhöhung nach der isolierten Perfusion belegte eine gewisse Ödembildung im isolierten Dünndarm, die jedoch deutlich unterhalb eines induzierten 30-minütigen Ischämie-Reperfusionsschadens lag [25]. Der Vergleich mit dem Feucht- zu Trockengewicht-Verhältnis im isoliert perfundierten Rattendünndarm-Modell [29] zeigte eine höhere Flüssigkeitseinlagerung im isoliert perfundierten Maudünndarm nach der Perfusion. Möglicherweise reagiert der Maudünndarm empfindlicher auf die isolierte Perfusion als der Rattendarm und zeigt schon bei einer geringeren Schädigung deutliche histomorphologische Veränderungen. Dies würden auch die Befunde der histomorphologischen Auswertung des Maudünndarms nach der Perfusion unterstützen, bei denen eine deutlich höhere Schädigung des Darmepithels als im Ratten-Modell beobachtet wurde.

Um den durch die Präparation entstandenen Schaden beurteilen zu können, wurden Gewebeproben des Maudünndarms direkt nach der Präparation fixiert und für die Auswertung aufbereitet. Es zeigten sich fast keine Schäden am Darmepithel vor der Perfusion

(Daten nicht gezeigt). Nach der Perfusion war der Histoscore deutlich niedriger, wobei es histomorphologisch deutliche Unterschiede in der Anzahl der geschädigten Enterozyten zwischen der mesenterialen und anti-mesenterialen Seite gab. Eine mögliche Ursache für diese unterschiedliche Schädigung kann in der vergleichsweise schlechteren Perfusion der anti-mesenterialen Seite durch das Gefäßsystem gesehen werden. Dies konnte im isoliert perfundierten Rattendünndarm-Modell ebenfalls beobachtet werden, wobei der Histoscore im Ratten-Modell deutlich höher lag [29]. Für die Ratte wurde gezeigt, dass die Intensität der Schädigung je nach untersuchter Position im Dünndarm eines Tieres und auch zwischen verschiedenen Individuen einer Versuchsgruppe stark variieren konnte. Am größten waren die Schäden in der unteren Hälfte des *Jejunums* [72]. Das Darmstück für die histomorphologische Auswertung des Maudünndarms nach der Perfusion wurde am Übergang zwischen Duodenum zum Jejunum genommen und sollte somit nicht die stärkste Schädigung aufweisen. Trotz der sichtbaren Schädigungen des mukosalen Epithels, konnte die Integrität dieser Barriere durch eine niedrige FITC-Dextran-Konzentration im luminalen Effluat gezeigt werden. Auch mit zunehmender Perfusionsdauer wurde in den Versuchen keine Permeabilisierung dieser Barriere gezeigt. Wahrscheinlich war die Schädigung des Darmepithels noch nicht ausreichend um für Makromoleküle wie das FITC-Dextran permeabel zu werden. Die EM-Aufnahmen bestätigen ebenfalls die Integrität der Tight Junctions nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen, so dass ein parazellulärer FITC-Dextran-Transfer ausgeschlossen werden kann. Ebenso beschränkt eine intakte endotheliale Barriere den Austritt von Makromolekülen ins Interstitium [67] und somit auch ins Darmlumen.

4.2.2. PAF-Stimulation

Um neben den stabilen Perfusionsbedingungen, der intakten Barrierefunktion und der metabolischen Aktivität des isoliert perfundierten Dünndarms auch die physiologische Reaktionsfähigkeit auf externe Stimuli zu belegen, wurde in einer Versuchsreihe PAF als ein typischer Mediator für Inflammation vaskulär appliziert. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird PAF nur minimal exprimiert und erst bei kardiovaskulären Stresssituationen wie akuter Inflammation, traumatischem oder septischem Schock und Ischämie-Reperfusionsschaden kommt es zur Ausschüttung durch die neutrophilen Granulozyten und Monozyten [73]. Nach Applikation eines PAF-Bolus von 12,5 pmol aufgelöst in 50 μ l (0,25 μ M) vaskulärem Puffer zeigten sich im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell diverse kurzfristige und teilweise reversible pathophysiologische

Veränderungen. Am signifikantesten war die Veränderung des Vasotonus nach der PAF-Gabe. Es kam zu einer kurzzeitigen und reversiblen Vasokonstriktion mit starkem arteriellem Druckanstieg. Im Ratten-Modell konnte nach einem PAF-Stimulus ein ähnlich hoher intraarterieller Druckanstieg ermittelt werden [29]. Ebenso kam es zu einer leichten nicht signifikanten Druckerhöhung im Lumen. Diese Befunde wurden auch in anderen Studien mit unterschiedlichen Organen und Spezies bestätigt. Dort führte PAF dosisabhängig zu einer Vasokonstriktion oder Vasodilatation mit assoziierter systemischer Hypo- oder Hypertension [73-76]. Neben der Veränderung im Vasotonus führte PAF zu einer Permeabilisierung der endothelialen und epithelialen Barriere. Diese konnte mit einer signifikanten Erhöhung der luminalen FITC-Dextran-Konzentration, der Flussrate des lymphatischen Effluats und des damit verbundenen höheren FITC-Dextran-Stoffmengentransports gezeigt werden. Die erhöhte Permeabilität zeigte sich in einem gesteigerten Flüssigkeitstransport von vaskulär zu lymphatisch und einer höheren Durchtrittsrate des Endothels und Epithels für große Moleküle wie FITC-Dextran von vaskulär zu luminal. Eine Erhöhung des intestinalen Lymphflusses nach PAF konnte im Katzendarm [77] und Rattendünndarm [29] gezeigt werden. Ebenso zeigten Untersuchungen eine erhöhte Permeabilität des Endothels in Ratten nach PAF [29, 78, 79]. Die im isoliert perfundierten Maudünndarm-Modell zur Permeabilitätsmessung genutzten Parameter zeigten nicht ausschließlich eine Permeabilisierung der endothelialen und epithelialen Barriere, da der durch PAF ausgelöste erhöhte vaskuläre Druck gleichzeitig einen höheren Filtrationsdruck von vaskulär nach interstitiel und luminal verursachte. Eine Differenzierung des durch den vaskulären Gefäßdruck erzeugten Filtrationseffekts von der permeabilisierenden Wirkung von PAF auf die Barriere konnte mit diesem Modell bislang nicht realisiert werden.

Funktionell wurden anhand der luminalen Galaktoseaufnahme keine signifikanten Veränderungen nach einem PAF-Stimulus ermittelt. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen im Rattendünndarm [29], wo eine PAF-Stimulation die Galaktoseresorption reversibel für 15 Minuten hemmte. Möglicherweise tritt dieser Effekt im Maus-Modell erst bei einer höheren PAF-Dosen ein, da in der Ratte mit 0,5 nmol deutlich mehr PAF eingesetzt wurde. Bei Untersuchungen in der isoliert perfundierten Mauslunge wurde zur Stimulation ein vergleichbar starker PAF-Stimulus wie im Maudünndarm eingesetzt [80]. Eine höhere PAF-Konzentration konnte im Mausmodell aufgrund der starken arteriellen Druckerhöhung und der Gefahr einer vaskulären Undichtigkeit nicht eingesetzt werden. Möglicherweise wurden das Darmgewicht und die Darmmotilität im Mausmodell aus diesem Grund ebenfalls nicht signifikant vom PAF-Bolus beeinflusst.

Aufgrund der weniger drastischen pathophysiologischen Veränderungen nach einem PAF-Bolus unterschieden sich im isoliert perfundierten Maudünndarm weder das venöse Laktat zu Pyruvat Verhältnis, Feucht- zu Trockengewicht noch der Histoscore von denen in der Kontrollgruppe. Ähnliche Befunde konnten auch im isoliert perfundierten Rattendünndarm gezeigt werden [29], dort konnte nach einer PAF-Stimulation bei den zuvor genannten Parametern ebenfalls keine signifikanten Veränderungen registriert werden. Möglicherweise war die durch den PAF-Bolus induzierte Schädigung nicht ausreichend um eine deutliche Veränderung im Feucht- zu Trockengewicht und des Histoscores zu bewirken. Eine *in vivo* Untersuchung von Sun et al. [76] konnte intestinale nekrotische Veränderungen in Mäusen erst nach sehr hohen letalen PAF-Gaben nachweisen.

4.3. Untersuchungen am Modell mit HES als vaskulärem Perfusat

Anhand des isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells sollte die intestinale Wirkung einer vaskulären Perfusion mit unterschiedlichen HES-Varianten auf die Flüssigkeitshomöostase, Barrierefunktion, metabolische Funktion und Histomorphologie untersucht werden. In der Klinik wird HES unter anderem als Infusionslösung bei Patienten mit akutem Volumenmangel eingesetzt. Da die intestinale Wirkung einer HES-Infusion bisher noch unzureichend erforscht wurde, können die Erkenntnisse dieser Studie dazu beitragen, das klinische Einsatzgebiet für HES-Präparate zu optimieren.

Die Untersuchung zur intestinalen Verträglichkeit von HES im Maudünndarm hat aktuell eine besondere Relevanz, da neueste Studien ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis für HES-Therapien belegten. In Patientenstudien brachte der Einsatz von HES als Infusionslösung keine signifikanten Vorteile gegenüber einer Therapie mit Kristalloiden. Vielmehr zeigten sich bei Patienten mit einer HES-Therapie eine höhere Mortalitätsrate und vermehrte Nierenschädigung [17, 18]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird der klinische Einsatz von HES durch die europäische Arzneimittelagentur, bis zur Prüfung des Ausschusses für Risikobewertung im Bereich der Pharmakovigilanz, nicht empfohlen [20]. Im Gegensatz zu diesen aktuellen Studien konnten andere Autoren auch positive Effekte einer HES-Perfusion auf die vaskuläre Barrierefunktion nachweisen [31-33]. Die neuen Befunde zur Verträglichkeit einer HES-Perfusion im Maudünndarm können dazu beitragen, das Verständnis zur Wirkung dieses Kolloids auf ein klinisch hochrelevantes Organ zu erweitern.

Die vaskuläre Perfusion des Maudünndarms mit HES 130/0,4 bzw. HES 200/0,5 verursachte im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikante Änderungen in der Flüssigkeitshomöostase, Barrierefunktion, metabolischen Funktion und Histomorphologie.

In beiden Versuchsgruppen kam es durch die Umstellung des vaskulären Puffers von BSA auf HES zu intraarterieller Druckerhöhung im perfundierten Maudünndarm. Diese Druckerhöhung wurde möglicherweise durch die unterschiedliche Viskosität der Perfusate verursacht. In Vorversuchen konnte für den 3 %igen HES-Puffer eine höhere Viskosität als für den 3 %igen BSA-Puffer festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der intraluminale Druck unterschied sich in beiden HES-Gruppen nicht signifikant von dem unter Kontrollbedingungen.

Nach der Umstellung des vaskulären Perfusats auf HES 130/0,4 bzw. 200/0,5 kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der luminalen Flussrate. Es kam zu einer Volumenverschiebung vom vaskulären ins lumenale Kompartiment mit einer signifikanten Reduktion der venösen Flussrate. Neben den gezeigten Flüssigkeitsverschiebungen kam es zu signifikanten endothelialen und epithelialen Barrierestörungen. Durch die Messung der FITC-Dextran-Konzentrationen der verschiedenen Effluat konnte in beiden Gruppen eine signifikante Erhöhung der luminalen FITC-Dextran-Konzentration nach einer HES-Perfusion nachgewiesen werden. Die Kombination von steigender luminaler Flussrate und hoher FITC-Dextran-Konzentration führte zu einer signifikanten Erhöhung des luminalen FITC-Dextran-Transfers gegenüber dem unter Kontrollbedingungen. Obwohl die HES-Konzentrationen im luminalen und lymphatischen Effluat nicht bestimmt wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass HES aus der vaskulären Perfusion in das lymphatische und lumenale Effluat übergetreten war. Die Daten der FITC-Dextran-Messungen bestätigen diese Vermutung. Es konnte gezeigt werden, dass die 150 kDa großen FITC-Dextran-Moleküle die endotheliale und epitheliale Barriere zunehmend passieren konnten. Diese Befunde stehen im Kontrast zu Studien wonach eine HES-Infusion bei Ratten vor einer LPS- und Sepsis-induzierten Permeabilisierung der Kapillaren schützt [32, 33]. Ebenso zeigte Dieterich et al. [31], dass eine HES-Behandlung bei Mäusen die Folgen einer Hypoxie-induzierten vaskulären Permeabilisierung verringert. Möglicherweise schützen die HES-induzierten antiinflammatorischen Effekte die Kapillaren *in vivo* [32], wohingegen diese immunoregulatorischen Mechanismen in einem *ex vivo* Modell nicht abgebildet werden können.

Unter physiologischen Bedingungen wird das infundierte HES in Patienten fast ausschließlich renal eliminiert und ist luminal kaum nachweisbar [81].

Eine Störung der metabolischen Funktion durch eine vaskuläre HES-Perfusion konnte in beiden HES-Gruppen nachgewiesen werden. In beiden Versuchsgruppen kam es zu einer signifikanten Reduktion bis hin zum vollständigen Ausfall der intestinalen Galaktoseaufnahme nach der Umstellung auf HES.

Bei der Perfusion mit HES 200/0,5 konnten zusätzliche Veränderungen festgestellt werden, die mit HES 130/0,4 nicht aufgetreten waren. Im Vergleich zur Gruppe unter Kontrollbedingungen kam es nach der HES 200/0,5-Perfusion zu einer signifikant erhöhten Gewichtszunahme des isolierten Dünndarms. Zusätzlich war der mittlere Histoscore in der Gruppe mit der HES 200/0,5-Perfusion signifikant niedriger als der unter Kontrollbedingungen.

Möglicherweise wird das HES 200/0,5-Präparat als Vorgänger-Generation des HES 130/0,4 bei einer Infusion schlechter vom Organismus vertragen. In einem Artikel kritisierte Stocker [82], dass eine Vielzahl der in Studien beobachteten negativen Effekte wie die verstärkte Nierenschädigung mit älteren HES-Generationen durchgeführt wurden. Eine Arbeit von Strunden et al. [83] zeigte in der perfundierten Mauslunge protektive Effekte von HES 130/0,4. Die Glykokalyx wurde durch HES 130/0,4 vor Degradation geschützt und zudem die Perfusion in den Mikrogefäßen, der pulmonale Arteriendruck und die interstitielle Ödembildung positiv beeinflusst. Eine Perfusion mit HES 200/0,5 hingegen bewirkte keinen dieser positiven Effekte [83]. Ebenso zeigte eine Untersuchung in isoliert perfundierten Schweine-Nieren einen stärkeren proinflammatorischen Effekt und vermehrten tubulären Schaden nach einer HES 200/0,5-Infusion als nach einer Infusion mit HES 130/0,4 [53].

Um histomorphologische Veränderungen auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen nach einer Perfusion mit HES 130/0,4 angefertigt. Es konnten vermehrte intrazelluläre Vakuolen und erweiterte interzelluläre Spalten gezeigt werden. Diese intrazellulären Vakuolen und erweiterten interzellulären Spalten könnten aufgrund der verstärkten Flüssigkeitsextravasation aus den Gefäßen ins Interstitium entstanden sein. Über interzelluläre Leckagen im Epithel des Dünndarms, z.B. an den Tight Junctions, wäre ein Übertritt von Flüssigkeit und Makromolekülen, wie FITC-Dextran, aus dem Interstitium möglich. In anderen Studien konnte ebenfalls eine Vakuolenbildung nach einer HES-Infusion in Organen wie Leber, Lunge und anderen Geweben nachgewiesen werden. Diese Vakuolen wurden in den Untersuchungen mit Speicherungsprozessen von HES im Gewebe assoziiert [52, 84].

Zusammenfassend konnte für die Perfusion mit 3 % HES 130/0,4 oder HES 200/0,5 eine massive Flüssigkeitsverschiebung von vaskulär zu luminal und zum Teil auch ins Interstitium

(lymphatisch) gezeigt werden. Diese war mit einer erhöhten endothelialen (vaskulär) und epithelialen (luminal) Permeabilisierung verbunden und führte zu einem Flüssigkeitsübertritt und der Extravasation von Makromolekülen aus dem vaskulären Kompartiment. Neben dem Verlust der vaskulären und luminalen Barrierefunktion kam es bei der HES-Perfusion zu einer Störung der metabolischen Funktion in Form einer signifikant verringerten Galaktoseaufnahme.

Eine mögliche Ursache für die beobachteten Effekte ist die Schädigung der Glykokalyx, durch verstärktes *shedding* während der HES-Perfusion. Als *shedding* wird die proteolytische Prozessierung eines Membranproteins bezeichnet, wobei ein lösliches Fragment in den extrazellulären Raum freigesetzt wird [85]. Das Endothel wird unter physiologischen Bedingungen von einer Glykokalyx ausgekleidet (siehe 1.1.3). Eine Schädigung der Glykokalyx führt unter anderem zu einer Verringerung der vaskulären Barrierefunktion und Erhöhung der Plättchen- und Leukozytenadhäsion am Endothel [86]. An isoliert perfundierten Meerschweinchen-Herzen konnte gezeigt werden, dass ein TNF- α induziertes *shedding* der Glykokalyx zu einer Erhöhung des koronaren Widerstandes, zu einem vaskulären Leck und zu einer verstärkten Permeabilität des Endothels für HES führte [87]. Eine Untersuchung von He et al. [88] beschreibt die Notwendigkeit von Albumin zur Erhaltung der kapillaren Permeabilität des Endothels. Ebenso zeigten Untersuchungen im *ex vivo* Modell des isolierten Meerschweinchen-Herzens, dass die Extravasation von Flüssigkeit nach einem induzierten Glykokalyxschaden bei einer Albumin-haltigen Perfusion signifikant niedriger war als bei einer HES-haltigen [89, 90]. Die Schädigung der Glykokalyx durch den Albuminmangel im vaskulären Perfusat könnte somit eine mögliche Ursache für den Verlust der Barrierefunktion im isoliert perfundierten Maudünndarm bei einer reinen HES-Perfusion darstellen. Entgegen dieser Ergebnisse konnte in einer Studie von Chappell et al. [91] eine Verringerung der vaskulären Permeabilität im isoliert perfundierten Meerschweinchen-Herz durch die Gabe von 2 % HES 130 kDa gezeigt werden. Diese Daten zeigen wie unterschiedlich die jeweiligen Modelle und Organe auf eine HES-Substitution reagieren. Möglicherweise kommt es auch zu direkten Interaktionen zwischen dem HES und der Glykokalyx. Diese Hypothese könnte durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Das isoliert perfundierte Dünndarm-Modell hat als *ex vivo* Modell einige Einschränkungen, die eine Nachbildung aller physiologischen Reaktionen einer *in vivo* HES-Infusion verhindert. Die Reduktion der intestinalen Permeabilität durch die Modulation der Immunantwort nach einer HES-Infusion [92] könnte ein möglicher Faktor für die Befunde der *in vivo* Studien

darstellen. Diese können im isoliert perfundierten Mausdünndarm-Modell mit einer blutfreien *Single Pass Perfusion* nicht nachgebildet werden.

Eine Abweichung im kolloidosmotischen Druck des vaskulären Perfusats kann als möglicher Faktor für die ermittelten Unterschiede zwischen der HES-Perfusion und den Kontrollbedingungen mit BSA-Perfusion ausgeschlossen werden. In Vorversuchen (siehe Tabelle 8) konnte für die 3 %igen HES-Puffer nur ein geringfügig höherer kolloidosmotischer Druck als bei 3 %iger BSA-Lösung bestimmt werden. Tendenziell wäre ein geringer vaskulärer Volumenverlust aufgrund des höheren kolloidosmotischen Drucks im HES-Puffer zu erwarten gewesen, was aber nicht der Fall war. Vielmehr kam es in beiden HES-Gruppen zu einem verstärkten vaskulären Volumenverlust, der nicht auf den Unterschied im kolloidosmotischen Druck zurückgeführt werden kann. Im klinischen Einsatz werden isoonkotische HES-Lösungen eingesetzt, die sich im KOD leicht unterscheiden [14]. Der erzeugte kolloidosmotische Druck einer Lösung im Gefäßsystem ist vom Status der Permeabilität der vaskulären Barriere abhängig [93]. Eine Studie von Dubniks et al. [94] zeigte, dass der Volumeneffekt von infundierter Albumin-Lösung bei erhöhter vaskulärer Permeabilität signifikant besser war als mit einer HES 130/0,4-Lösung. Demnach könnte der durch HES in den Gefäßen erzeugte kolloidosmotische Druck aufgrund der erhöhten vaskulären Permeabilisierung im isolierten Mausdünndarm niedriger ausfallen, als der kolloidosmotische Druck vom BSA unter denselben Bedingungen.

Die Ergebnisse aus der Versuchsgruppe mit einer 4 % HES 200/0,5 RPMI 1640-Perfusion bestätigen die Befunde aus der 3 % HES 130/0,4 und 3 % HES 200/0,5-Gruppe. Auch mit einer 4 %igen HES-Perfusion kam es zu signifikanter Störung der Flüssigkeitshomöostase, der Barrierefunktion und der metabolischen Funktion. Eine Verträglichkeit des 4 %igen HES 200/0,5 RPMI 1640-Mediums [50] für den isoliert perfundierten Mausdünndarm konnte nicht gezeigt werden. Wahrscheinlich waren die funktionsbedingten physiologischen und morphologischen Unterschiede zwischen Lunge und Darm zu groß und somit auch ihre Verträglichkeit gegenüber einer HES-Perfusion unterschiedlich. Dies belegt wie differenziert die unterschiedlichen Organe derselben Spezies auf die HES-Perfusion reagieren.

4.4. Fazit

In der vorliegenden Arbeit gelang es, basierend auf einem Ratten-Modell des isoliert perfundierten Dünndarms [29] ein neues, isoliert perfundiertes Mausdünndarm-Modell zu etablieren und zu validieren. Hierzu wurden die Narkose, die Präparation, die

Perfusionsanlage, die Perfusionsparameter und die notwendigen Analysemethoden modifiziert und validiert. Zusätzlich wurde das Mäusdünndarm-Modell funktionell durch den Einsatz eines PAF-Stimulus überprüft.

Mit diesem Maus-Modell wurden Untersuchungen zur intestinalen Verträglichkeit von 3 % HES 130/0,4 (Krebs-Henseleit), 3 % HES 200/0,4 (Krebs-Henseleit) und 4 % HES 200/0,5 (RPMI 1640-Medium) als vaskuläres Perfusat durchgeführt. Es zeigte sich eine Permeabilisierung der endothelialen und epithelialen Barriere, eine zunehmende Flüssigkeitsverschiebung von vaskulär ins Interstitium und das Darmlumen sowie einen metabolischen Funktionsverlust und histomorphologische Veränderungen. Diese Befunde unterstützen die Ergebnisse aktueller Studien, wonach eine HES 130/0,4-Therapie bei Patienten mit schwerer Sepsis zu erhöhter Mortalität und Nierenschäden führt [17, 18]. Aufgrund dieser Daten sollte der Einsatz von HES bei Patienten mit septischen Schockzuständen aufgrund des möglichen permeabilisierenden Effekts nicht empfohlen werden. Eine HES-Infusion könnte eine Verstärkung der Sepsis-induzierten Ödembildung zur Folge haben, welche das Mortalitätsrisiko der betroffenen Patienten erhöht. Somit bestätigt diese Studie die Empfehlung des Ausschusses für Risikobewertung im Bereich der Pharmakovigilanz der europäischen Arzneimittelagentur. Dieser Ausschuss hat kürzlich eine Empfehlung veröffentlicht, wonach HES bei Patienten mit Sepsis, bei kritisch kranken und Patienten mit Verbrennungen aufgrund des erhöhten Risikos einer Nierenschädigung und Mortalität nicht mehr angewendet werden soll [20].

4.5. Ausblick

In zukünftigen Versuchen wäre eine Anpassung des vaskulären Perfusats mit HES und BSA sinnvoll, um die Effekte der klinisch eingesetzten HES-Dosen im isoliert perfundierten Mäusdünndarm untersuchen zu können. Zudem sollte ein *shedding* der Glykokalyx des Endothels bei einer vaskulären HES-Perfusion untersucht werden. Eine Möglichkeit wäre der Nachweis von Glykokalyx-Bestandteilen wie z.B. dem Syndecan-1 im vaskulären Effluat als Indikator für verstärktes *shedding*. So kann geprüft werden, ob eine geringfügige BSA-Substitution zum HES-Puffer die Stabilität der Glykokalyx begünstigt und ein *shedding* verringert. Zudem ist eine Untersuchung der durch HES vermittelten Mechanismen im Gewebe möglich, um die möglichen Ursachen der Permeabilisierung einzugrenzen. Hierzu könnte beispielsweise das Claudin-3 (Protein der Tight Junctions) oder PARP-1 (DNA-Reparaturenzym) in Western Blots nach einer HES-Perfusion nachgewiesen werden.

Ebenso könnte der Nachweis von inflammatorischen Prozessen im Gewebe eine mögliche Erklärung der veränderten Barrierefunktion nach der HES-Perfusion erklären.

5. Zusammenfassung

Im klinischen Einsatz werden bei intravasalem Volumenmangel neben kristalloiden auch kolloidale Infusionslösungen wie die Hydroxyethylstärke (HES) zur Therapie eingesetzt. Das Ziel dieser Flüssigkeitssubstitution ist eine Wiederherstellung des intravasalen Volumens und die Vermeidung von kardiovaskulär bedingter Hypoxie in Organen und Geweben. Aktuell wird der klinische Einsatz von HES kontrovers diskutiert, da neue Studien ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis für HES aufzeigten. Bislang wurde die intestinale Wirkung einer HES-Perfusion sowie die assoziierten physiologischen und zellulären Mechanismen trotz der hohen klinischen Relevanz des Darms im Rahmen der Sepsis und Ödembildung kaum untersucht, was unter anderem auch auf das Fehlen geeigneter *ex vivo* Modelle zurückzuführen ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der physiologischen und zellulären Effekte einer vaskulären Perfusion mit HES auf die intestinale endotheliale und epitheliale Permeabilität unter Verwendung eines neu etablierten *ex vivo* Maudünndarm-Modells.

Hierzu wurden Dünndärme aus C57/BL6 Mäusen unter Sevofluran/Ketamin-Narkose isoliert und an ein für das Mausmodell modifiziertes Perfusionssystem angeschlossen. Für die erfolgreiche Etablierung mussten zahlreiche systemspezifische Anpassungen vorgenommen werden. Neben Veränderungen an den Kanülen, der Perfusionsparameter und der Waagen, wurde eine neue Vorrichtung für den Transfer des isolierten Maudünndarms (*in vivo*) in die Perfusionskammer (*ex vivo*) entwickelt. Zur Validierung des Modells wurden die Maudünndärme vaskulär mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA) in modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert (Kontrollgruppe) und in einer weiteren Gruppe mit einem Bolus Plättchen aktivierender Faktor (PAF) stimuliert. Für die Untersuchung der intestinalen Verträglichkeit von HES wurde das vaskuläre Perfusat nach 60 Minuten Equilibrierungsphase von 3 % BSA auf 3 % HES 130/0,4 bzw. HES 200/0,5 gewechselt. Folgende Parameter wurden untersucht: Perfusionsraten und Perfusionsdrücke, die Flüssigkeitshomöostase, die Barriereintegrität, die luminale Galaktoseaufnahme, die Histomorphologie, das Laktat zu Pyruvat Verhältnis, das Feucht- zu Trockengewicht, die Sauerstoffaufnahme, der pH-Wert der Perfusate, die Darmmotilität und die Gewichtsveränderung des Darms. Die Barriereintegrität wurde anhand der Übertrittsrates des vaskulär applizierten FITC-Dextrans in das interstitielle und das luminale Effluat bestimmt. Nach der Perfusion wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Darms in der Kontrollgruppe und der HES 130/0,4-Gruppe angefertigt.

Es wurde sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Gruppe mit PAF-Stimulus eine intakte Flüssigkeitshomöostase, Barrierefunktion und luminale Galaktoseaufnahme über die Versuchsdauer nachgewiesen. Bis auf histomorphologische Schäden am Darmepithel zeigten die untersuchten Parameter einen funktionell intakten, isoliert perfundierten Maudünndarm. Eine Umstellung des vaskulären Perfusats von 3 % BSA auf 3 % HES 130/0,4 oder 3 % HES 200/0,5 führte zu signifikanten Veränderungen in der Funktion, Flüssigkeitshomöostase, Permeabilität und Morphologie des Maudünndarms. Die vaskuläre Perfusion mit HES verursachte eine signifikante Zunahme bei der Flüssigkeitsverschiebung vom vaskulären zum luminalen Kompartiment, was eine Störung der endothelialen und epithelialen Barrierefunktion suggerierte. Dieser Befund wurde durch die Ergebnisse des FITC-Dextran-Transfers unterstützt. Das vaskulär applizierte FITC-Dextran konnte unter Kontrollbedingungen die endotheliale und epitheliale Barriere nicht überwinden und war luminal nur in geringen Mengen nachweisbar. Bei der vaskulären Perfusion mit HES stieg der FITC-Dextran-Transfer von vaskulär nach luminal aufgrund der zunehmenden Permeabilisierung der Barriere signifikant an. Zudem konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen histomorphologische Veränderungen in Form von vermehrten intrazellulären Vakuolen und erweiterten interzellulären Spalten im Darmepithel nach einer HES-Perfusion nachgewiesen werden. Zusätzlich führte die Perfusion mit HES zu einer signifikanten Reduktion der luminalen Galaktoseaufnahme, was eine mögliche Störung der Resorptionsprozesse im Darm durch HES zeigte.

In der vorliegenden Arbeit konnte das isoliert perfundierte Maudünndarm-Modell erfolgreich etabliert und validiert werden. Eine Perfusion mit 3 % HES führte im verwendeten *ex vivo* Maus-Modell zu einer Störung der Flüssigkeitshomöostase und erhöhter Permeabilität des Endothels und Epithels mit signifikanten histomorphologischen Veränderungen des Epithels. Als vaskuläres Perfusat war das eingesetzte HES im isoliert perfundierten Maudünndarm unverträglich. Dieser Befund unterstützt die Empfehlung der europäischen Arzneimittelagentur wonach eine HES-Therapie bei Sepsis und schwerkranken Patienten nicht eingesetzt werden soll.

6. Summary

For the clinical therapy of acute volume deficiency crystalloids and colloids like hydroxyethyl starch (HES) are often used for the substitution of fluids and restoration of intravascular volume to avoid cardiovascular caused hypoxia in organs and tissues. The usage of HES is currently controversially discussed due to recent studies which show a negative benefit-risk-ratio. Clinical situations with intestinal related problems like sepsis and edema formation are common and improved knowledge about the physiological and cellular mechanisms is needed. Up to now the intestinal effect of HES perfusion has not been well investigated owing to the absence of suitable *ex vivo* models.

The goal of this work was to study the physiological and cellular effects of vascular HES perfusion on the intestinal endothelial and epithelial permeability. For this purpose an *ex vivo* small intestine mouse model was established.

The small intestine was isolated from with sevoflurane and ketamine anesthetized C57/BL6 mice. Numerous changes like the modification of the cannulas, perfusion parameters and electronic balances were needed to establish a specific perfusion system. A newly developed transport device ensures the transfer of the small intestine *in vivo* into the perfusion chamber *ex vivo*. For validation purposes a modified Krebs-Henseleit solution with 3 % bovine serum albumin (BSA) was used (control group) with or without an additional bolus of platelet-activating factor (PAF). To investigate the intestinal tolerance to HES 3 % BSA was used in the equilibration phase and switched to 3 % HES 130/0.4 and 3 % HES 200/0.5, respectively. Perfusion rate, perfusion pressure, fluid homeostasis, barrier integrity, luminal galactose uptake, histomorphology, lactate to pyruvate ratio, wet to dry weight ratio, oxygen uptake, perfusate pH, bowel motility and bowel weight changes were observed. Barrier integrity was measured by vascularly applied FITC-dextran and its transfer rate into the interstitial and luminal compartment. Electron micrographs were taken in the control group and HES 130/0.4 group after perfusion.

The fluid homeostasis, barrier integrity, and luminal galactose uptake during perfusion was intact in the control group as well as in the PAF group. Observed parameters confirmed a functional intestine despite apparent histomorphological damage in intestinal epithelia. In comparison a perfusion with HES 130/0.4 or HES 200/0.5 led to significant alteration in fluid distribution from vascular into the luminal compartment. This was accompanied by a significant increment of FITC-dextran transfer from the vascular to luminal side, demonstrating a barrier dysfunction and increased permeability after HES perfusion. In

normal cases vascularly applied FITC-dextran cannot permeate the endothelial and epithelial barrier and only small amounts of FITC-dextran are lumenally detectable. Electron micrographs showed histomorphological changes with extended intercellular spaces and increased intracellular vacuoles. Perfusion with HES reduced the luminal galactose uptake significantly and suggested dysfunction in resorption.

The present work presents a successful establishment and validation of an isolated perfused mouse small intestine. Perfusion with HES showed dysfunction in fluid homeostasis and increased endothelial and epithelial permeability. Histomorphological alterations were observed and support the assumption of intestinal intolerance for vascular HES perfusion in mice. These results support the recommendation of the European medicine agency to avoid HES therapy in sepsis and critically ill patients.

7. Anhang

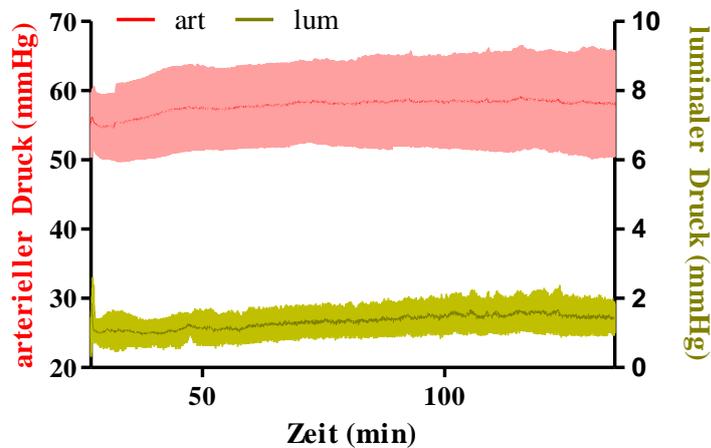


Abbildung 69: Mittlerer intraarterieller und intraluminaler Druck (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). Der arterielle (rot, linke Y-Achse) und lumenale Druck (gelb, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung (n=4).

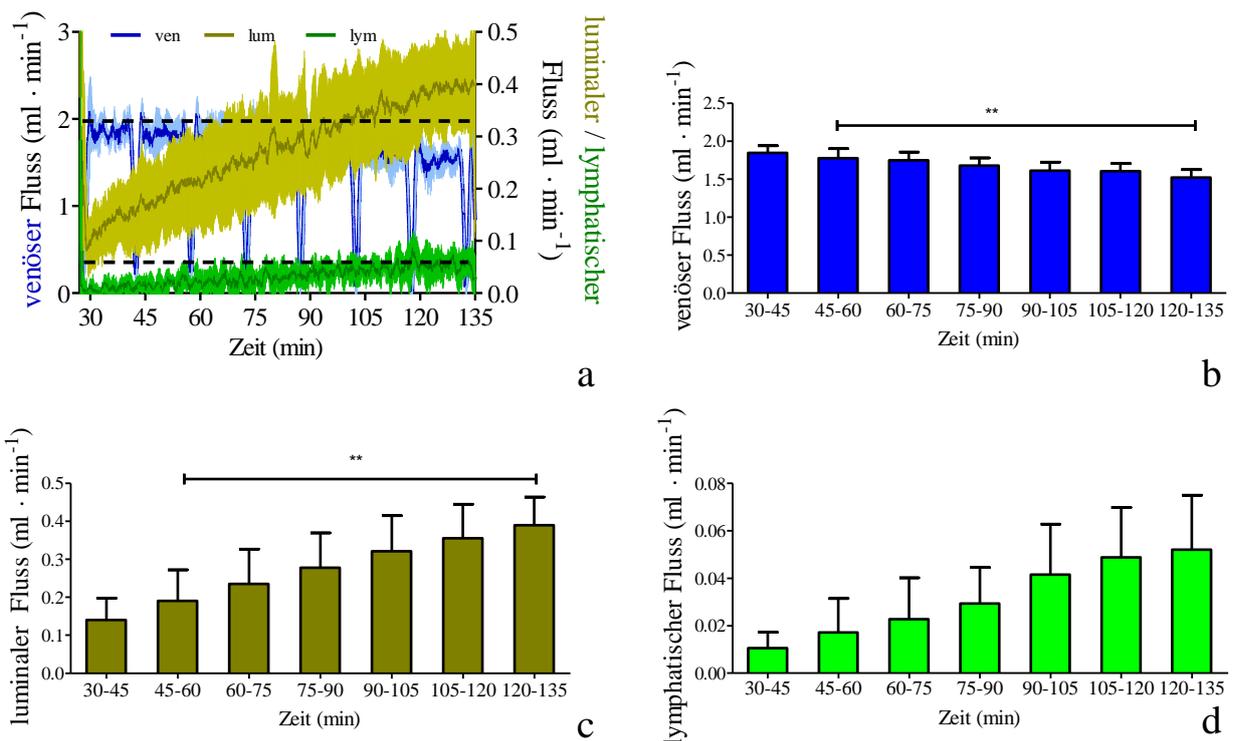


Abbildung 70: Mittlere venöse, lumenale und lymphatische Flussraten (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).

Gezeigt werden in a die venösen (blau, linke Y-Achse), lumenalen (gelb, rechte Y-Achse) und lymphatischen Flussraten (grün, rechte Y-Achse) mit der Standardabweichung (n=4). Die schwarz gestrichelten Linien markieren die voreingestellte Perfusionsgeschwindigkeit der vaskulären (2 ml/min) und lumenalen (0,06 ml/min) Perfusion (Erwartungswerte). Die Flussraten wurden aus den Gewichtsdaten der Effluat berechnet. Die venösen Artefakte in 15-minütigen Abständen wurden durch die Probenentnahmen verursacht und stellten keinen tatsächlichen Abfall der Flussrate dar. In b wird die mittlere venöse Flussrate, in c die mittlere lumenale Flussrate und in d die mittlere lymphatische Flussrate mit der Standardabweichung gezeigt; einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); ** = $p < 0,01$.

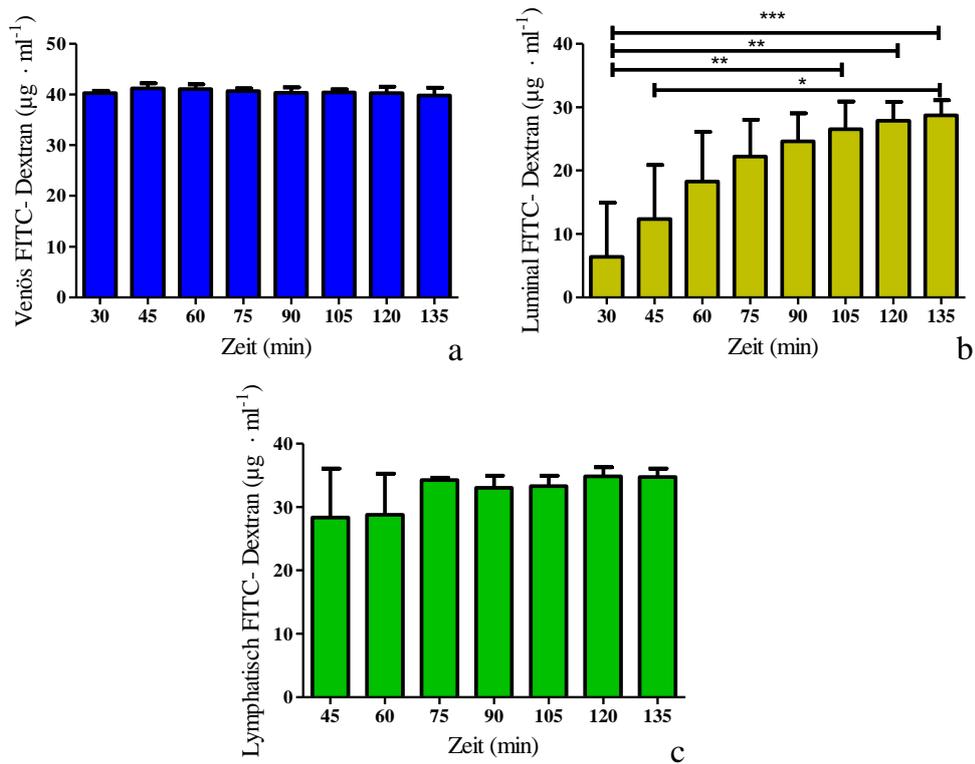


Abbildung 71: Mittlere FITC-Dextran-Konzentration in den Effluaten (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). Dargestellt sind die FITC-Dextran Konzentrationen im venösen (a, blau) luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Kompartiment mit der Standardabweichung (n=4); einfaktorielle ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

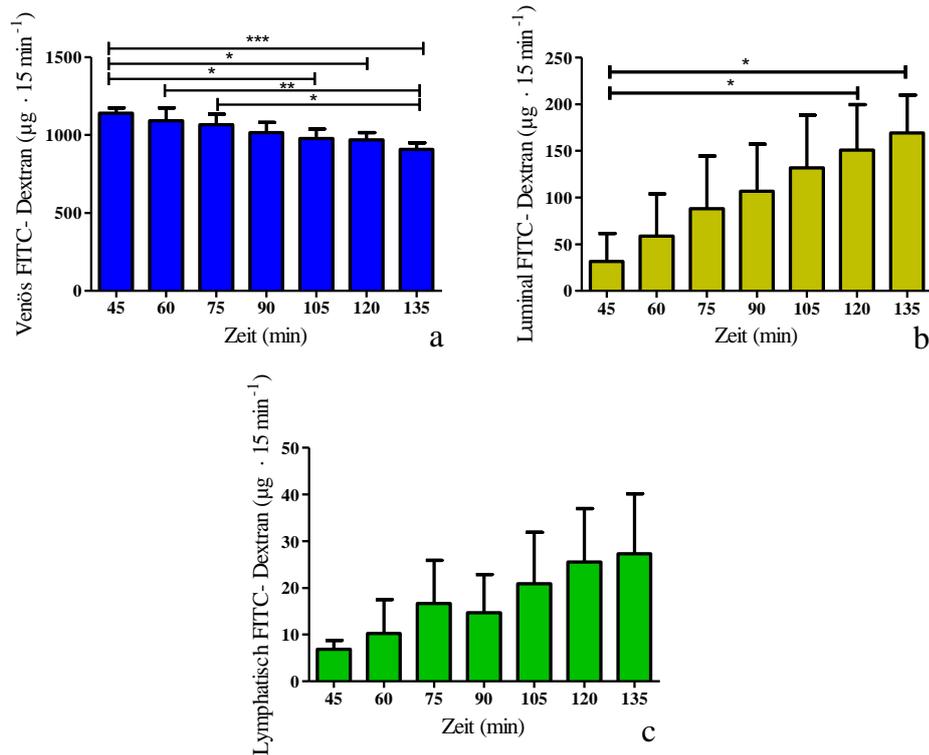


Abbildung 72: Mittlerer FITC-Dextran-Transfer in 15 Minuten Intervallen (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). Gezeigt wird der FITC-Dextran-Transfer mit der Standardabweichung im venösen (a, blau), luminalen (b, gelb) und lymphatischen (c, grün) Effluat. Dies wurde aus den Gewichtsdaten und FITC-Dextran-Konzentrationen im 15 Minuten Intervall berechnet (n=4); einfaktorische ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

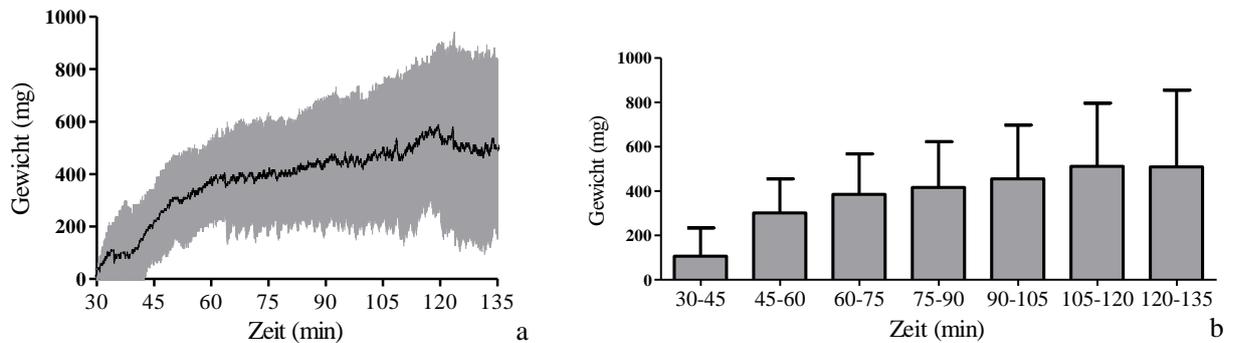


Abbildung 73: Mittlere Gewichtszunahme des Darms (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). Dargestellt wird die mittlere Gewichtszunahme des Darms mit der Standardabweichung (a) und die mittlere Gewichtszunahme in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (b) (n=4).

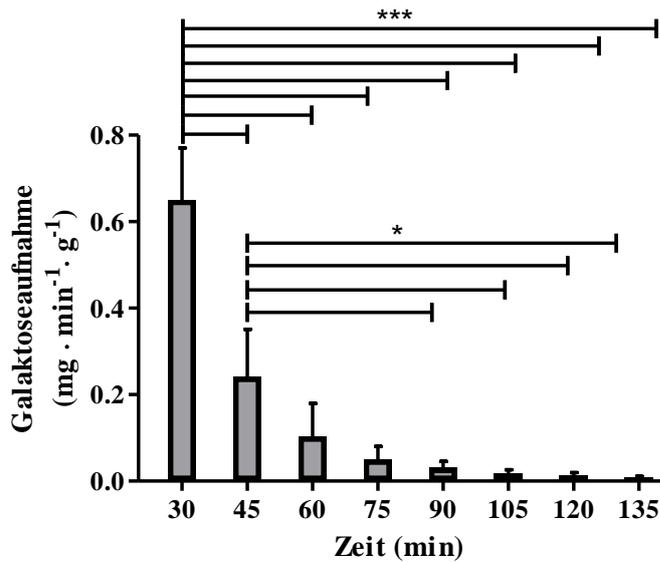


Abbildung 74: Mittlere luminale Galaktoseaufnahme des Darms mit der Standardabweichung (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).

Probenentnahme alle 15 Minuten, die Galaktoseaufnahme wurde auf das Trockengewicht normiert (n=4); einfaktorielle ANOVA (Bonferroni Post-Test); * = p < 0,05; *** = p < 0,001.

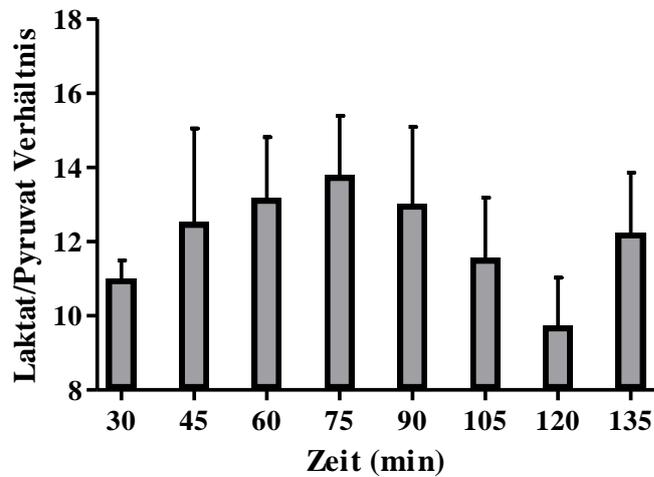


Abbildung 75: Mittleres Laktat zu Pyruvat Verhältnis (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640).

Verhältnis berechnet aus venösen Proben in 15 Minuten Intervallen mit der Standardabweichung (n=4).

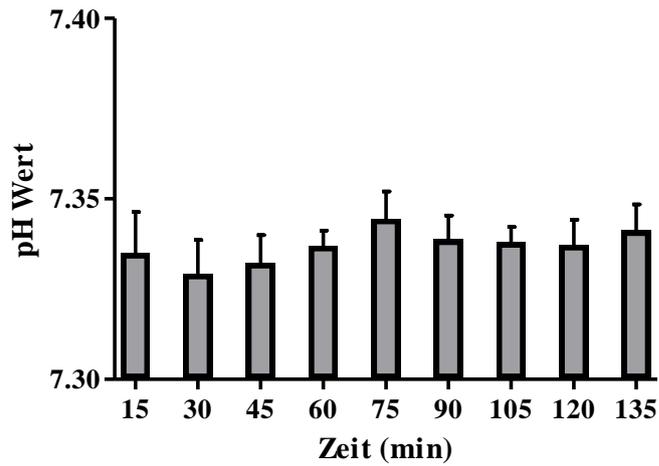


Abbildung 76: Mittlerer arterieller pH-Wert mit der Standardabweichung (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). (n=4).

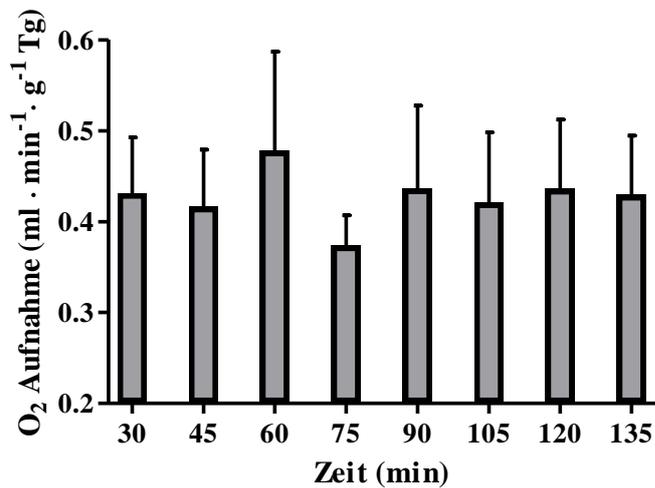


Abbildung 77: Mittlere Sauerstoffaufnahme des Dünndarms (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). Sauerstoffaufnahme normiert auf das Trockengewicht des Darms mit der Standardabweichung (n=4).

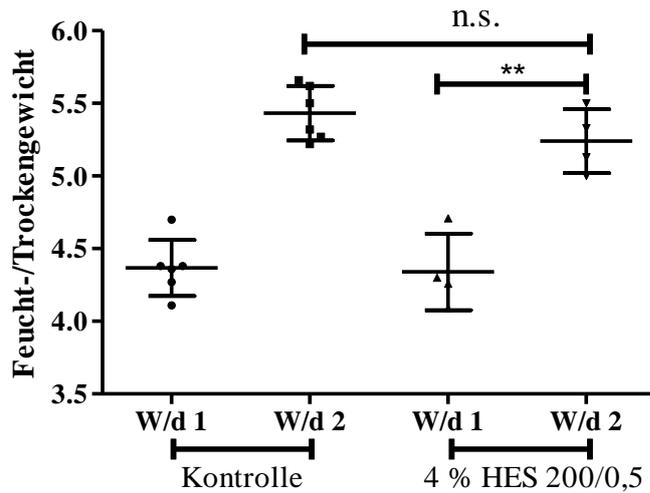


Abbildung 78: Mittleres Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Darms unter Kontrollbedingungen und mit 4 % HES 200/0,5 RPMI 1640-Puffer.

Dargestellt werden die Mittelwerte mit der Standardabweichung, W/d 1 = Probe vor Perfusion, W/d 2 = Probe nach Perfusion. Die Anzahl der Replikate unter Kontrollbedingungen beträgt $n=6$ und mit 4 % HES 200/0,5 $n=4$; t-Test; n.s. = $p > 0,05$; ** = $p < 0,01$.

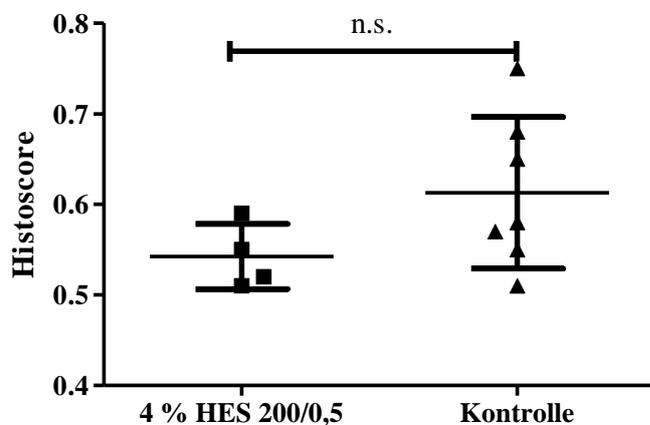


Abbildung 79: Mittlerer Histoscore des Darms nach der Perfusion unter Kontrollbedingungen und mit HES 4 % 200/0,5 RPMI 1640-Puffer.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung in der Kontrollgruppe ($n=7$) und in der HES 4 % 200/0,5-Gruppe ($n=4$); t-Test; n.s. = $p > 0,5$.

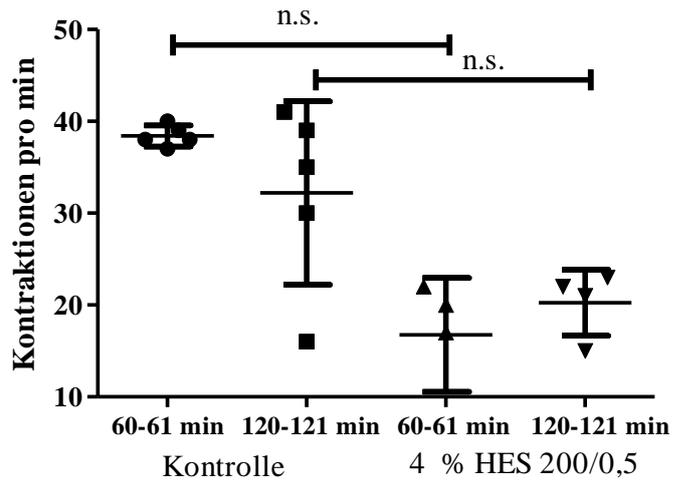


Abbildung 80: Mittlere Darmmotilität (4 % HES 200/0,5 RPMI 1640). Gezeigt wird die Anzahl der Kontraktionen zum Zeitpunkt 60-61 min und 120-121 min mit der Standardabweichung (n=4); t-Test; n.s. = $p > 0,05$.

Tabelle 8: Kolloidosmotischer Druck der vaskulären Perfusate in Krebs-Henseleit-Puffer.

Kolloidzusammensetzung	Kolloidosmotischer Druck
3 % BSA	$7,55 \pm 0,04$ mmHg
3 % HES 130/0,4	$9,95 \pm 0,31$ mmHg
3 % HES 200/0,5	$9,55 \pm 0,17$ mmHg
4 % HES 200/0,5	$14,3 \pm 0,01$ mmHg

8. Literatur

1. Clauss, C. and W. Clauss, *Humanbiologie kompakt* 2009: Springer Spektrum.
2. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. Vol. 4. 2006: Thieme.
3. Junqueira, L.C.U. and J. Carneiro, *Histologie*. Vol. 6. 2008: Manfred Gratzl.
4. Lang, F. and P. Lang, *Basiswissen Physiologie*. Vol. 2. 2008: Springer. 483.
5. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2011: Springer.
6. Chappell, D., et al., [*Expedition glycolyx. A newly discovered "Great Barrier Reef"*]. *Anaesthesist*, 2008. 57(10): p. 959-69.
7. Adams, H.A., *Volumen- und Flüssigkeitsersatz- Physiologie, Pathophysiologie, Pharmakologie und klinischer Einsatz (Teil 1)*. *Anästh Intensivmed*, 2007: p. 448-460.
8. Robert F. Schmidt, G.T., Florian Lang, *Physiologie des Menschen* Vol. 28. 2007: Springer. S. 49.
9. Dieterich, H.J., [*Colloids in intensive care*]. *Anaesthesist*, 2001. 50(1): p. 54-68.
10. Kreimeier, U. and S. Prückner, *Volumentherapie bei Hypovolämie und Schock*. *Notfall & Rettungsmedizin*. Vol. 1. 1998.
11. Zander, R., *Flüssigkeitstherapie*. Vol. 2. 2009: Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Melsungen.
12. Adams, H.A., [*Hemodilution and infusion therapy for hypovolemic shock. Clinical physiological and pharmacological aspects*]. *Anaesthesist*, 2007. 56(4): p. 371-9.
13. Förster, H., *Hydroxyethylstärke als Plasmaersatz*. Vol. 35. 1997, *Krankenpfl J*.
14. Ertmer, C., et al., *Relevance of non-albumin colloids in intensive care medicine*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2009. 23(2): p. 193-212.
15. Striebel, H.W., *Operative Intensivmedizin: Sicherheit in der klinischen Praxis*. Vol. 1. 2007: Schattauer GmbH.
16. Adams, H.A., *Volumen- und Flüssigkeitsersatz- Physiologie, Pathophysiologie, Pharmakologie und klinischer Einsatz (Teil 2)* *Anästh Intensivmed*, 2007: p. 518-540.
17. Myburgh, J.A., et al., *Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care*. *N Engl J Med*, 2012. 367(20): p. 1901-11.
18. Perner, A., et al., *Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis*. *N Engl J Med*, 2012. 367(2): p. 124-34.

19. EMA, *Hydroxyethyl-starch solutions (HES) should no longer be used in patients with sepsis or burn injuries or in critically ill patients- CMDh endores PRAC recommendations*. European Medicines Agency, 2013. October
20. BfArM, *Hydroxyethylstärke (HES): Start eines europäischen Risikobewertungsverfahrens*. Bulletin Zur Arzneimittelsicherheit, 2013. 1 März.
21. Bjarnason, I. and T.J. Peters, *In vitro determination of small intestinal permeability: demonstration of a persistent defect in patients with coeliac disease*. Gut, 1984. 25(2): p. 145-50.
22. Jackson, P.G., et al., *Intestinal permeability in patients with eczema and food allergy*. Lancet, 1981. 1(8233): p. 1285-6.
23. Friedman, G., E. Silva, and J.L. Vincent, *Has the mortality of septic shock changed with time*. Crit Care Med, 1998. 26(12): p. 2078-86.
24. Le Ferrec, E., et al., *In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods*. Altern Lab Anim, 2001. 29(6): p. 649-68.
25. Kanwar, S., M.J. Hickey, and P. Kubes, *Postischemic inflammation: a role for mast cells in intestine but not in skeletal muscle*. Am J Physiol, 1998. 275(2 Pt 1): p. G212-8.
26. Athman, R., et al., *In vivo absorption of water and electrolytes in mouse intestine. Application to villin -/- mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. 282(4): p. G634-9.
27. Clarke, L.L. and M.C. Harline, *CFTR is required for cAMP inhibition of intestinal Na⁺ absorption in a cystic fibrosis mouse model*. Am J Physiol, 1996. 270(2 Pt 1): p. G259-67.
28. Takeuchi, T., et al., *Solute diffusion through stripped mouse duodenum*. J Physiol Pharmacol, 2007. 58(4): p. 767-91.
29. Lautenschlager, I., et al., *A model of the isolated perfused rat small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. 298(2): p. G304-13.
30. Dombrowsky, H., et al., *Ingestion of (n-3) fatty acids augments basal and platelet activating factor-induced permeability to dextran in the rat mesenteric vascular bed*. J Nutr, 2011. 141(9): p. 1635-42.
31. Dieterich, H.J., et al., *Effect of hydroxyethyl starch on vascular leak syndrome and neutrophil accumulation during hypoxia*. Crit Care Med, 2006. 34(6): p. 1775-82.

32. Tian, J., et al., *The effects of hydroxyethyl starch on lung capillary permeability in endotoxic rats and possible mechanisms*. *Anesth Analg*, 2004. 98(3): p. 768-74, table of contents.
33. Lv, R., et al., *Mechanism of the effect of hydroxyethyl starch on reducing pulmonary capillary permeability in a rat model of sepsis*. *Ann Clin Lab Sci*, 2005. 35(2): p. 174-83.
34. Kerl, H., C. Garbe, and L. Cerroni, *Histopathologie der Haut*. Vol. 3. 2003: springer.
35. Bye, W.A., C.H. Allan, and J.S. Trier, *Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum*. *Gastroenterology*, 1984. 86(5 Pt 1): p. 789-801.
36. Klide, A.M., *Anesthetic depth: the undefinable*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1992. 22(2): p. 435-7.
37. Flecknell, P.A., *Anaesthesia of common laboratory species*. Vol. 2. 1996, Laboratory Animal Anaesthesia: Academic Press London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto.
38. Wixon, S.K. and K.L. Smiller, *Anesthesia and analgesia in rodents* 1997, Anesthesia and analgesia in laboratory animals: Academic press, New York London.
39. Muir, W.W., H. J.A.E., and S. R.T., *Handbook of Veterinary Anesthesia*. Vol. 3. 2000.
40. Larsen, R., *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie* Vol. 8. 2012: Springer.
41. Adams, H.A., *[S-(+)-ketamine. Circulatory interactions during total intravenous anesthesia and analgesia-sedation]*. *Anaesthesist*, 1997. 46(12): p. 1081-7.
42. Garrelds, I.M., et al., *Intestinal blood flow in murine colitis induced with dextran sulfate sodium*. *Dig Dis Sci*, 2002. 47(10): p. 2231-6.
43. Wollenberg, P. and W. Rummel, *Vectorial release of sulfoconjugates in the vascularly perfused mouse small intestine*. *Biochem Pharmacol*, 1984. 33(2): p. 205-8.
44. Mols, R., et al., *Intestinal perfusion with mesenteric blood sampling in wild-type and knockout mice: evaluation of a novel tool in biopharmaceutical drug profiling*. *Drug Metab Dispos*, 2009. 37(6): p. 1334-7.
45. Thurlby, P.L. and P. Trayhurn, *Regional blood flow in genetically obese (ob/ob) mice. The importance of brown adipose tissue to the reduced energy expenditure on non-shivering thermogenesis*. *Pflugers Arch*, 1980. 385(3): p. 193-201.
46. Yang, S., et al., *Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse*. *Shock*, 2002. 17(1): p. 55-60.

47. Mills, P.A., et al., *A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry*. J Appl Physiol, 2000. 88(5): p. 1537-44.
48. Janssen, B.J. and J.F. Smits, *Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(6): p. R1545-64.
49. von Bethmann, A.N., et al., *Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(1): p. 263-72.
50. Siegl, S. and S. Uhlig, *Using the one-lung method to link p38 to pro-inflammatory gene expression during overventilation in C57BL/6 and BALB/c mice*. PLoS One, 2012. 7(7): p. e41464.
51. Rehm, M., et al., *Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed*. Anesthesiology, 2004. 100(5): p. 1211-23.
52. Parth, E., et al., *Histological and immunohistochemical investigations of hydroxyethyl-starch deposits in rat tissues*. Eur Surg Res, 1992. 24(1): p. 13-21.
53. Huter, L., et al., *Hydroxyethylstarch impairs renal function and induces interstitial proliferation, macrophage infiltration and tubular damage in an isolated renal perfusion model*. Crit Care, 2009. 13(1): p. R23.
54. Donovan, J. and P. Brown, *Current Protocols in Immunology*, 1998. p. 1.4.1-1.4.5.
55. Wolfensohn, S. and M. Lloyd, *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare* Vol. 4. 2013: John Wiley & Sons.
56. Ionac, M., *One technique, two approaches, and results: thoracic duct cannulation in small laboratory animals*. Microsurgery, 2003. 23(3): p. 239-45.
57. Morse, S.I. and S.K. Riester, *Studies on the leukocytosis and lymphocytosis induced by Bordetella pertussis. II. The effect of pertussis vaccine on the thoracic duct lymph and lymphocytes of mice*. J Exp Med, 1967. 125(4): p. 619-28.
58. Jackson, *The Jackson Laboratory Physiological Data Summary C57BL/6J*, 2005, www.jax.org/phenome.
59. Schottek, W., *Untersuchungen über die normale Transportgeschwindigkeit eines Kontrastbreies im Ratten- Maudünndarm*. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, 1965. 141: p. 17-20.
60. Sjoblom, M. and O. Nylander, *Isoflurane-induced acidosis depresses basal and PGE(2)-stimulated duodenal bicarbonate secretion in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. 292(3): p. G899-904.

61. Dittmer, P.L. and D.S. Altman, *Biology Data Book Volume III* 1974: Federation of American Societies for Experimental Biology.
62. Fan, Y.K., et al., *Ionophores have limited effects on jejunal glucose absorption and energy metabolism in mice*. J Anim Sci, 2003. 81(8): p. 2072-9.
63. Wright, E.M., M.G. Martin, and E. Turk, *Intestinal absorption in health and disease--sugars*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. 17(6): p. 943-56.
64. Boehm, O., et al., *Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice*. Biol Chem, 2007. 388(5): p. 547-54.
65. Waymouth, C., *Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells*. In Vitro, 1970. 6(2): p. 109-27.
66. Bogeski, G., et al., *A quantitative approach to recording peristaltic activity from segments of rat small intestine in vivo*. Neurogastroenterol Motil, 2005. 17(2): p. 262-72.
67. Hulstrom, D. and E. Svensjo, *Intravital and electron microscopic study of bradykinin-induced vascular permeability changes using FITC-dextran as a tracer*. J Pathol, 1979. 129(3): p. 125-33.
68. Tordoff, M.G., A.A. Bachmanov, and D.R. Reed, *Forty mouse strain survey of voluntary calcium intake, blood calcium, and bone mineral content*. Physiol Behav, 2007. 91(5): p. 632-43.
69. Burchardi, H., *Die Intensivmedizin*. Vol. 11. 2011: Springer.
70. Grishina, E.V., et al., *Accelerated utilization of lactate under the effect of hypoxen after intensive exercise*. Bull Exp Biol Med, 2008. 145(2): p. 198-201.
71. Toth, B., et al., *The role of gammadelta T cells in the regulation of neutrophil-mediated tissue damage after thermal injury*. J Leukoc Biol, 2004. 76(3): p. 545-52.
72. Petrat, F., et al., *Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score*. J Invest Surg, 2010. 23(4): p. 208-17.
73. Montrucchio, G., G. Alloatti, and G. Camussi, *Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology*. Physiol Rev, 2000. 80(4): p. 1669-99.
74. Uhlig, S., R. Goggel, and S. Engel, *Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung*. Pharmacol Rep, 2005. 57 Suppl: p. 206-21.
75. Bar-Natan, M.F., et al., *Platelet-activating factor and sepsis-induced small intestinal microvascular hypoperfusion*. J Surg Res, 1995. 58(1): p. 38-45.
76. Sun, X., et al., *P-selectin-deficient mice are protected from PAF-induced shock, intestinal injury, and lethality*. Am J Physiol, 1997. 273(1 Pt 1): p. G56-61.

-
77. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: role of adherent leukocytes*. *Am J Physiol*, 1990. 258(1 Pt 1): p. G158-63.
 78. O'Brien, J.G., et al., *Effects of tranexamic acid and aprotinin, two antifibrinolytic drugs, on PAF-induced plasma extravasation in unanesthetized rats*. *Inflammation*, 2000. 24(5): p. 411-29.
 79. Wallace, J.L., et al., *Evidence for platelet-activating factor as a mediator of endotoxin-induced gastrointestinal damage in the rat. Effects of three platelet-activating factor antagonists*. *Gastroenterology*, 1987. 93(4): p. 765-73.
 80. Held, H.D., C. Martin, and S. Uhlig, *Characterization of airway and vascular responses in murine lungs*. *Br J Pharmacol*, 1999. 126(5): p. 1191-9.
 81. Lenz, K., et al., *Intestinal elimination of hydroxyethyl starch?* *Intensive Care Med*, 2000. 26(6): p. 733-9.
 82. Stocker, R., *Hypovolämie und Volumenersatztherapie*, in *TMJ2008*, Rosenfluh Publikationen. p. 23-24.
 83. Strunden, M.S., et al., *Glycocalyx degradation causes microvascular perfusion failure in the ex vivo perfused mouse lung: hydroxyethyl starch 130/0.4 pretreatment attenuates this response*. *Shock*, 2012. 38(5): p. 559-66.
 84. Sirtl, C., et al., *Tissue deposits of hydroxyethyl starch (HES): dose-dependent and time-related*. *Br J Anaesth*, 1999. 82(4): p. 510-5.
 85. Mullberg, J., et al., *The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology*. *Eur Cytokine Netw*, 2000. 11(1): p. 27-38.
 86. Rehm, M., et al., *Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia*. *Circulation*, 2007. 116(17): p. 1896-906.
 87. Chappell, D., et al., *TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin*. *Basic Res Cardiol*, 2009. 104(1): p. 78-89.
 88. He, P. and F.E. Curry, *Albumin modulation of capillary permeability: role of endothelial cell [Ca²⁺]_i*. *Am J Physiol*, 1993. 265(1 Pt 2): p. H74-82.
 89. Jacob, M., et al., *The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels*. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(3): p. 575-86.

-
90. Jacob, M., et al., *Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability*. *Anesthesiology*, 2006. 104(6): p. 1223-31.
 91. Chappell, D., et al., *Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx*. *Anesthesiology*, 2007. 107(5): p. 776-84.
 92. Feng, X., et al., *Protective roles of hydroxyethyl starch 130/0.4 in intestinal inflammatory response and survival in rats challenged with polymicrobial sepsis*. *Clin Chim Acta*, 2007. 376(1-2): p. 60-7.
 93. Jacob, M. and D. Chappell, *Mythen und Fakten der perioperativen Infusionstherapie*. *Anästhesiologie und Intensivmedizin*, 2009. 6: p. 358-376.
 94. Dubniks, M., J. Persson, and P.O. Grande, *Plasma volume expansion of 5% albumin, 4% gelatin, 6% HES 130/0.4, and normal saline under increased microvascular permeability in the rat*. *Intensive Care Med*, 2007. 33(2): p. 293-9.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder danke ich für die Unterstützung und Begutachtung meiner Arbeit und besonders PD Dr. Martin Albrecht für die Hilfe bei der Optimierung der Arbeit.

Am UKSH Kiel danke ich Prof. Dr. med. Markus Steinfath, Prof. Dr. med. Berthold Bein, Prof. Dr. med. Norbert Weiler und Prof. Dr. med. Inéz Frerichs für ihre Unterstützung.

Allen Mitarbeitern aus dem Labor der Anästhesie am UKSH Kiel und am Forschungszentrum Borstel danke ich für das gute Arbeitsklima und die reibungslose Zusammenarbeit, insbesondere Jürgen Sarau, Heike Dombrowsky, Karina Zitta und Ingmar Lautenschläger für die zahlreichen Hilfestellungen.

Bei den Mitarbeitern der Pathologie in Borstel bedanke ich mich für die Aufbereitung der histologischen Schnitte und bei der Arbeitsgruppe Mukosale Immunologie und Diagnostik für die Hilfe bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Einen besonderen Dank an meine Familie und Freunde, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

10. Curriculum vitae

Name: Wong

Vorname: Yuk Lung

Geburtsdatum: 10.03.1981

Geburtsort: Koblenz

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion	seit 2009	Am Forschungszentrum Borstel Titel: Untersuchungen zur intestinalen Verträglichkeit von Hydroxyethylstärke Etablierung und Validierung eines neuen isoliert perfundierten Maudünndarm-Modells
Studium	2001-2008	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Hauptfach: Zoologie Nebenfächer: Limnologie, Toxikologie
	2007-2008	Diplomarbeit an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Titel: Untersuchungen zum Einfluss hoher pH-Werte in Verbindung mit hoher und niedriger Karbonathärte auf das Wachstum und Mortalität des Edelkrebses <i>Astacus astacus</i>
Schulbildung	1997-2001	Thomas-Mann-Oberschule (Oberstufe), Berlin
	1993-1997	Gustav-Freytag-Oberschule (Realschule), Berlin
	1988-1993	Grundschule an der Peckwisch, Berlin

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Arbeit an keiner anderen Universität im Rahmen eines Prüfungsverfahrens zur Begutachtung vorgelegt wurde.

Teile der Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert und veröffentlicht:

Der Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie, 2013:

„Hydroxyethylstärke erhöht die intestinale endotheliale und epitheliale Permeabilität: Untersuchungen an einem isoliert perfundierten Maudünndarmmodell“

26th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, 2013:

“Hydroxyethylstarch Augments Basal Endothelial And Epithelial Permeability In The Isolated Perfused Mouse Small Intestine“

Deutscher Anästhesiecongress, 2014 (eingereicht):

„Untersuchungen der intestinalen zellulären Mechanismen einer Perfusion mit Hydroxyethylstärke unter Verwendung eines isoliert perfundierten Maudünndarmmodells“.

Kiel, den 10.12.2013

Yuk Lung Wong