

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr.med. Dr.h.c.mult. K. Meßmer

**Computergesteuertes Perfusionssystem  
zur normothermen ex-vivo Vorbehandlung von  
Dünndarmtransplantaten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Jan David Krapp  
aus  
Ratingen

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Dr.med.vet. C. Hammer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr.med. F. Christ  
Priv. Doz. Dr.med. K. Hallfeldt

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr.med. M. J. Stangl

Dekan: Prof. Dr.med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2002

# Computergesteuertes Perfusionssystem zur normothermen ex-vivo Vorbehandlung von Dünndarmtransplantaten



**Abbildung 1:** Dünndarmsegment während ex-vivo Perfusion: Die PE-Folie zum Abdecken wurde entfernt. Das Organ befindet sich auf dem Probenteller mit dem Ablauf für das venöse Blut im Zentrum. Am Mesenterium sind die kanülierte A. mesenterica sup. und ihre ligierten Abgänge zu erkennen. Die Darmenden sind in Auffangbehältnisse neben dem Probenteller ausgelagert.

## Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung und Problemstellung	6
1.1	Historischer Überblick und Stand der Forschung	11
1.1.1	Modelle zur Transplantatabstoßung	11
1.1.2	Klinisch-historischer Überblick	16
1.1.3	Überblick ex-vivo Darmperfusion	17
1.2	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Versuchsmaterial	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Versuchstiere	32
2.1.3	Perfusionsflüssigkeit	33
2.1.4	Medikamentöse Zusätze	34
2.1.5	Gasförmige Zusätze	37
2.1.6	Versuchsgruppen	38
2.2	Untersuchungsmethoden	39
2.2.1	Versuchsvorbereitungen	39
2.2.2	Versuchsdurchführung und Auswertung	44
2.2.3	Statistische Auswertung	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Online Computeraufzeichnungen	55
3.1.1	Flussraten	55
3.1.2	Perfusionsdruck	61
3.1.3	Arterieller Sauerstoffpartialdruck	65
3.1.4	pH	71
3.1.5	Temperatur	75
3.2	Untersuchungen im Perfusat	76
3.2.1	Glukoseverbrauch	76
3.2.2	Laktatproduktion	77
3.2.3	Leukozyten	80
3.2.4	Hämatokrit	82
3.2.5	Natrium	84
3.2.6	Kalium	85
3.2.7	Osmolarität	87
3.2.8	Sauerstoffverbrauch	89
3.2.9	Maltoseabsorption	92
3.2.10	Freies Hämoglobin	95
3.3	Lichtmikroskopie	98
4	Diskussion	103

5	Schlussfolgerung .....	114
6	Zusammenfassung .....	116
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	117
8	Tabellarischer Anhang .....	120
8.1	Einzelwerte der Computeraufzeichnungen .....	120
8.2	Literaturverzeichnis.....	125

# 1 Einleitung und Problemstellung

Patienten die mehr als die Hälfte ihres Dünndarms verloren haben entwickeln ein sogenanntes Kurzdarmsyndrom (KDS). Wenn mehr als 100 cm des distalen Ileums mitbetroffen sind, kann durch den Wegfall der spezifischen Resorptionsorte für Gallensäuren und für Vitamin-B<sub>12</sub>, bereits ein geringerer Verlust von Dünndarm zu Störungen führen [129]. Bei einem Restdünndarm von weniger als 150 cm ist eine dauerhafte parenterale Ernährung zwingend notwendig, da die Resorptionskapazität des übrig gebliebenen Dünndarms zum Überleben des Patienten nicht mehr ausreicht.

Die häufigsten Ursachen, die zur Entwicklung eines KDS führen, sind in Tabelle 1 aufgeführt [120]. Bei Kindern sind die häufigsten Gründe für ein KDS ein Volvulus, eine Gastroschisis, Darmatresien und eine nekrotisierende Enterokolitis. Bei Erwachsenen

**Tabelle 1: Ursachen für ein Versagen der Dünndarmfunktion, Indikationen für eine Dünndarmtransplantation und die Ergebnisse nach Dünndarmtransplantation [20]**

Ursachen für KDS	Anzahl	DDTx indiziert	Ergebnisse
Morbus Crohn	28 (14%)	14 (50 %)	mittel
Thrombose/ Embolie	24 (12%)	10 (42 %)	mittel
Nekrotisierende Enterokolitis	23 (11%)	18 (78 %)	schlecht
Volvulus	18 (9 %)	14 (78 %)	mittel
Pseudoobstruktion	16 (8 %)	12 (75 %)	#
Gastroschisis	14 (7 %)	13 (93 %)	gut
Trauma	12 (6 %)	7 (58 %)	mittel
Intestinale Atresie	8 (4 %)	8 (100 %)	schlecht
Strahlenenteritis	5 (2 %)	2 (40 %)	#
Familiäre Polyposis	5 (2 %)	3 (60 %)	#
Morbus Hirschsprung	3 (1 %)	3 (100 %)	gut
Budd-Chiari Syndrom	3 (1 %)	2 (67 %)	#
Desmoidtumor	2 (1 %)	2 (100 %)	schlecht
Microvillous inclusion disease	2 (1 %)	2 (100 %)	gut
Andere*	40 (20 %)	14 (35 %)	#
<b>Σ</b>	<b>203</b>	<b>124 (61 %)</b>	

\* Iatrogen, eosinophile Gastroenteritis, Amyloidose, Sklerodermie und andere Autoimmunerkrankungen, Neoplasien des Intestinaltrakts, seltene angeborene Malabsorptionssyndrome, Gardner-Syndrom

\*\* Ergebnisse des Transplantatüberlebens (5JÜ) nach der ursprünglichen Darmerkrankung: gut=>40%, mittel= 20-40%, schlecht= <20%

# Keine Angabe

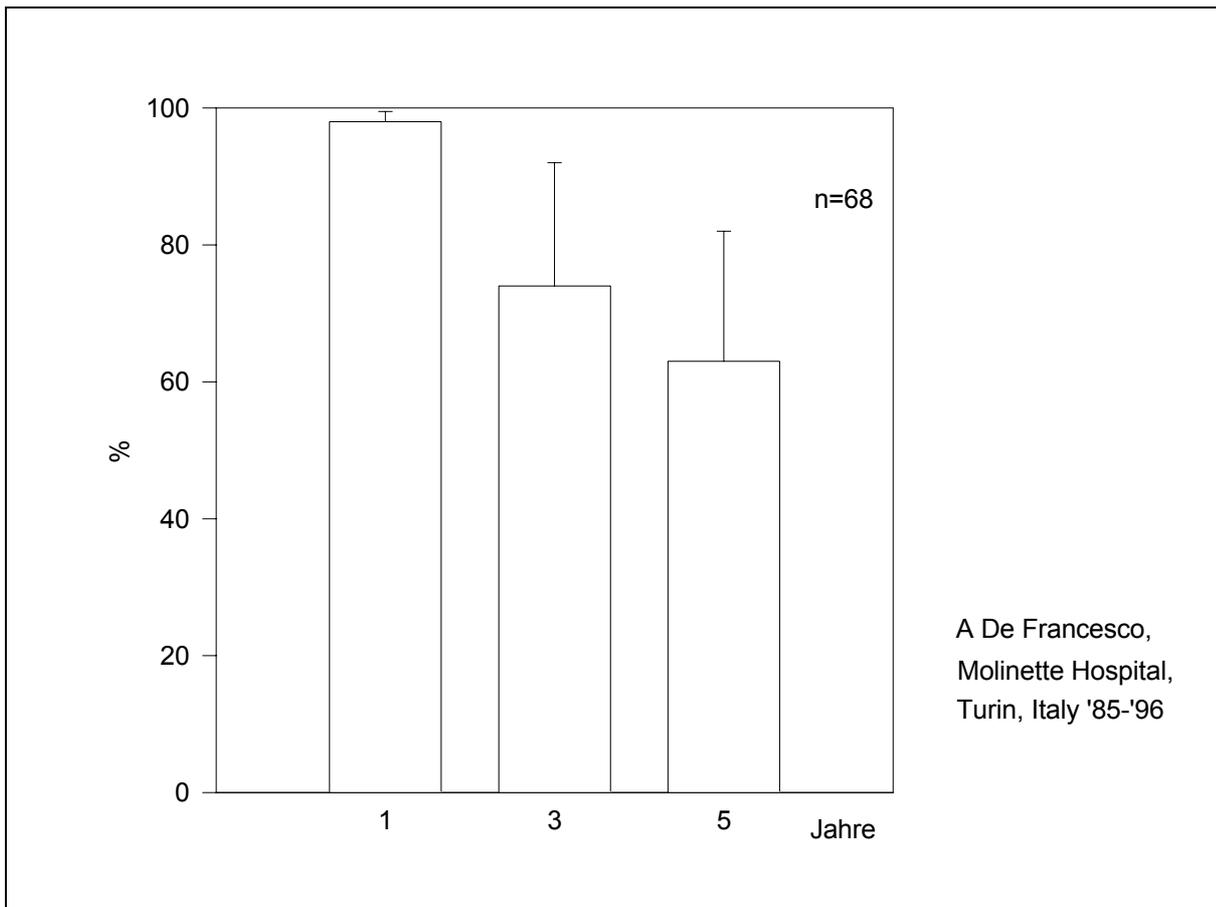
sind es vaskuläre und traumatische Ursachen sowie der Morbus Crohn [1]. Etwa zwei Drittel der Patienten, bei denen wegen eines KDS eine Dünndarmtransplantation (DDTx) durchgeführt wurde, sind Kinder oder Jugendliche bis 16 Jahre [49]. Das KDS macht mehr als 80 % aller Indikationsstellungen für eine Dünndarmtransplantation aus [1,48]. Weitaus seltenere Indikationen sind Dysmotilitätssyndrome (10 %), Enterozytendysfunktionen (3 %) und in wenigen ausgewählten Fällen Neoplasien des Intestinaltrakts (6 %) [1,48].

Die jährliche Inzidenz des KDS liegt in Nordamerika bei 0,1-0,2 / 100.000 EW, die Prävalenz liegt bei 1,4 / 100.000 EW [6,74,9]. In Deutschland liegen die Patientenzahlen bei einer Inzidenz von 0,28 / 100.000 EW und einer Prävalenz von 1,2 / 100.000 EW [9].

Klinisch imponiert das Kurzdarmsyndrom durch eine wässrig-chologene Diarrhö und Steatorrhö. Durch den Verlust von Gallensäuren und Störungen im Oxalatstoffwechsel kommt es überdurchschnittlich häufig zu Gallen- und Nierensteinen. Störungen im Elektrolythaushalt führen zu Adynamie, neuromuskulären Störungen und zu einer Osteopathie durch Störungen im Kalziumhaushalt. Zusätzlich kommt es zu Gewichtsverlust, hämorrhagischer Diathese und makrozytärer Anämie durch Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel [129].

Der derzeitige Therapiestandard für das Kurzdarmsyndrom ist die zu Hause durchgeführte "Totale Parenterale Ernährung" (home parenteral nutrition: HPN). Diese Therapieform ist jedoch mit einer relativ hohen Komplikationsrate und einer ebenfalls recht hohen Letalität belastet (s. Abbildung 2). Zusätzlich ist die Lebensqualität der Patienten durch die aufwendige parenterale Ernährung und die eingeschränkte orale Nahrungsaufnahme deutlich reduziert [32].

Die Komplikationen, die unter dieser Behandlung typischerweise auftreten, sind Thrombosen, Infektionen des Katheters bis hin zur Sepsis, Hypertriglyceridämien, Leberschäden, Gallensteinbildung und Osteopathien. Im Vergleich zwischen DDTx und HPN gibt es bei der Untersuchung der Überlebensraten zur Zeit noch einen



**Abbildung 2: Überlebensraten von Patienten unter totaler parenteraler Ernährung (TPN)**

deutlichen Vorteil zugunsten der HPN. Die DDTx findet deshalb hauptsächlich bei den Patienten Anwendung, bei denen die HPN aufgrund der oben genannten Komplikationen nicht mehr durchführbar ist.

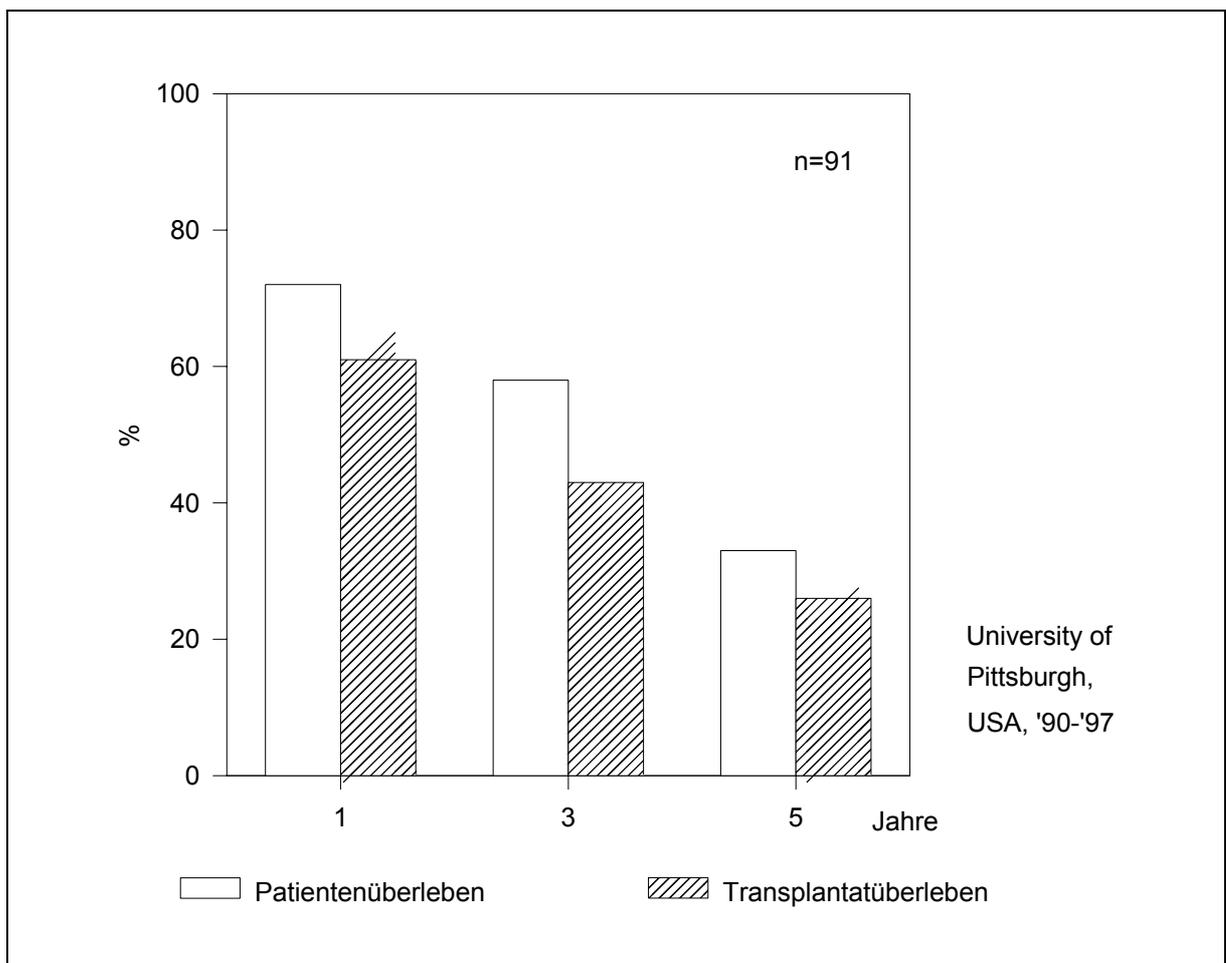
An der University of Pittsburgh wurden bis heute mehr als die Hälfte aller Dünndarmtransplantationen weltweit durchgeführt. Bei der Auswertung der Patienten, die zwischen 1994 und 1999 ein Dünndarmtransplantat erhalten haben, konnte mit einem 4-Jahresüberleben des Transplantats von 65 % ein deutlich besseres Ergebnis festgestellt werden [1,50]. Ein ähnlicher Trend ist auch in anderen großen Transplantationszentren zu beobachten [110,46,105]. 77 % der Patienten sind nach der Transplantation von der HPN unabhängig und ihre Lebensqualität hat sich somit deutlich verbessert [49,131].

Die Kosten für eine Dünndarmtransplantation betragen ca. 130.000 US-\$, die Kosten für eine Leber-Dünndarmtransplantation ca. 210.000 US-\$ und die Kosten für eine Multiviszeraltransplantation ca. 220.000 US-\$. Im Vergleich mit der zu Hause

durchgeführten Totalen Parenteralen Ernährung (HPN), die zwischen 80.000 und 120.000 US-\$ pro Jahr kostet, ist die DDTx bereits im zweiten Jahr nach Transplantation kostengünstiger als die HPN [1].

Die Transplantation der Organe Niere, Leber und Herz ist in den meisten Transplantationszentren zur Routine geworden. Durch den Einsatz moderner Immunsuppressiva ist ein Langzeitüberleben des Transplantats der Regelfall.

Auch in der Lungen- und Pankreastransplantation sind in den letzten Jahren, durch eine Verbesserung der Operationstechnik und den Einsatz neuerer Immunsuppressiva deutliche Fortschritte gemacht worden, so dass diese Therapien heute ausgewählten Patienten angeboten werden können.



**Abbildung 3: Patient- und Transplantatüberlebensraten nach DDTx; Daten der University of Pittsburgh, USA, '90-'97**

Im Gegensatz dazu befindet sich die Dünndarmtransplantation, trotz ähnlicher Langzeitergebnisse wie bei einer Lungentransplantation, immer noch weitgehend im experimentellen Stadium. Einer der Hauptgründe hierfür ist, dass die Dünndarmtransplantation aufgrund der besonderen Immunologie und der damit verbundenen hohen Immunogenität des Organs, nicht in dem Maße von den Neuentwicklungen im Bereich der Immunsuppressiva profitieren konnte, wie es bei der Transplantation anderer Organe der Fall war.

Es stellt sich daher die Frage, ob auch in der Zukunft jemals die alleinige pharmakologische Immunsuppression ausreichend sein wird, um die Dünndarmtransplantation in der Klinik etablieren zu können, oder ob hier andere Konzepte, wie zum Beispiel eine Organvorbehandlung zur Reduktion der Immunogenität, angewendet werden müssen.

## 1.1 Historischer Überblick und Stand der Forschung

### 1.1.1 Modelle zur Transplantatabstoßung

In den letzten 40 Jahren wurden verschiedene Modelle zur Erforschung der Transplantatabstoßung entwickelt. Dabei hat sich die Theorie, dass es sich um ein immunologisches Phänomen handelt, das mittels Erkennung und Antwort gegenüber genetisch definierten Transplantationsantigenen arbeitet, weitgehend etabliert [108,112,115,11].

Die Erkennung von fremden Antigenen setzt eine Interaktion der immunkompetenten Zellen des Empfängers mit dem fremden Antigen des Transplantates voraus [100,88]. Diese Sensibilisierung erfolgt in mehreren Schritten, die sequentiell, aber auch parallel ablaufen.

Folgende Einzelschritte lassen sich dabei unterscheiden:

1. Adhäsion und Transplantatinfiltation von Empfängerlympho/leukozyten [121,122,118,64]
2. Antigen Präsentation durch "passenger leukocytes" [64,21,44,45,23]
3. Reifung und Proliferation der infiltrierenden Zellen im Transplantat [4,5,117,116]
4. Migration der "passenger leukocytes" vom Transplantat in Milz und Lymphknoten des Empfängers [85,8,89,91]
5. Sensibilisierung und Proliferation von immunkompetenten Empfängerzellen in den lymphatischen Kompartimenten des Empfängers [89,40,56,140,29]

Der Ablauf dieser Kaskade führt unbeeinflusst zur Abstoßung des Transplantates. An Einflussmöglichkeiten stehen derzeit vor allem die spezifische Immunsuppression mit poly- oder monoklonalen Antikörpern (ALG, OKT3) und die unspezifische Immunsuppression mit Cyclosporin A, Azathioprin, Cortison, MMF und Tacrolimus zur Verfügung. Zu den allgemeinen Nebenwirkungen wie erhöhtes Infektionsrisiko [39] und vermehrtes Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen treten medikamentenspezifische Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität (CyA, Tacrolimus), Diabetogenität (Tacrolimus) und Hepatotoxizität (CyA).

Neben der Weiterentwicklung spezifischer Immunsuppressiva stellt die Organvorbehandlung ex-vivo mit dem Ziel der Reduktion der Immunogenität einen neuen Therapieansatz dar. Die Attraktivität dieses Therapieverfahrens besteht darin, dass es ohne Nebenwirkung für den Empfänger durchgeführt werden könnte. Das Ausmaß der postoperativen Immunsuppression könnte deutlich vermindert und somit das Risiko von Infektionen und medikamentenspezifischen Nebenwirkungen gesenkt werden. Untersuchungen zur Abstoßungsreaktion in Transplantaten zeigen mehrere Möglichkeiten der therapeutischen Interaktion ex vivo auf:

1. Der erste Schritt einer Abstoßungsreaktion ist vergleichbar mit dem Beginn einer Entzündungsreaktion. Es kommt zur Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am mikrovaskulären Endothel des Transplantates. Das Ausmaß dieser Leukozyten-Endothel Interaktion ist abhängig von Blutfluss, der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Stärke der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel. Die Akkumulation von Leukozyten führt sowohl zur Stimulierung als auch zur Zerstörung von Endothelzellen [160]. Es kommt zur Freisetzung von Mediatoren wie PAF [161], PDGF, EDRF [18] und PGI<sub>2</sub> [73] welche den Prozess unterhalten. Die Mediatoren bewirken Endothelzellkontraktion, Denudation und Zelllyse, eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Extravasation von Plasma und Makromolekülen, und die Erhöhung des mikrovaskulären Hämatokrit mit Beeinträchtigung des Blutflusses. Am Endothel kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie GMP-140 [43], ICAM-1 [141], VCAM [139,128], ELAM-1 [12] und IL-8 [153], welche die Adhäsion und Migration von Leukozyten und mononukleären Zellen unterstützen. Die weitere Freisetzung von Mediatoren wie Il-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , und IFN- $\gamma$  aus der Endothelzelle und adhärennten Leukozyten führt zur Zerstörung der Basalmembran und erlaubt so unter anderem auch den Austritt von T-Zellen in das Gewebe [103,134].
2. Snell [144] vertrat 1957 erstmals die Meinung, dass durch Beseitigung der "passenger lymphocytes" aus dem Spenderorgan vor Transplantation möglicherweise eine Verringerung der Immunogenität und eine Verlängerung der Überlebenszeit des Transplantats erreicht werden kann. Zu diesen "passenger leukocytes" zählen vor allem die sogenannten "dendritischen Zellen". Dendritische

Zellen sind als die stärksten Stimulatoren in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) [152] bekannt. Verschiedene Untersuchungen konnten nachweisen, dass die Stimulation einer MLC durch nicht-dendritische Zellen direkt proportional zur Kontamination der Zellkultur mit dendritischen Zellen ist [81]. Dendritische Zellen erfüllen die Bedingungen der sogenannten Zwei-Signal Hypothese zur maximalen Aktivierung von T-Zellen [86,135]. Signal eins (das Antigen) stellt die Bindung des T-Zell-Rezeptors an die kombinierte Bindungsstelle (Klasse II Molekül und verarbeitetes Antigen) der allogenen Antigen präsentierenden Zelle dar; Signal zwei (der Costimulator) besteht in der Freisetzung von Lymphokinen (IL-2) aus der allogenen Antigen präsentierenden Zelle. Unterstützt wird diese Theorie durch eine Vielzahl von Experimenten, in welchen durch eine Vorbehandlung von Zelltransplantaten oder intakten Organen, ein verlängertes Transplantatüberleben oder sogar Toleranz gegenüber dem Transplantat erreicht werden konnte. Die Vorbehandlungsprotokolle zur Depletion der "passenger leukocytes" umfassen dabei Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen [107,157,162,93], den Einsatz zytotoxischer Medikamente [146], die Kultivierung von Zellen in einer Atmosphäre von 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> [87], die UVB-Bestrahlung [61] und die Vorbehandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen Klasse II Antigene oder dendritische Zellen [145,36,71,26]. In allen Experimenten konnte gezeigt werden, dass für eine erfolgreiche Vorbehandlung des Transplantates eine nahezu komplette Depletion der "passenger leukocytes" notwendig ist und bereits geringe Mengen von dendritischen Zellen die Immunogenität wieder deutlich erhöhen [92]. Darüber hinaus war in allen Fällen eine Vorbehandlung des Spenders entweder über mehrere Tage oder mehr als 24 Stunden vor Transplantation notwendig. Dies ist in der klinischen Situation nicht möglich, die Durchführung einer normothermen, oxygenierten ex-vivo Perfusion des Transplantates könnte dieses Problem jedoch überwinden [97].

3. Untersuchungen von Ascher [4,5] konnten zeigen, dass infiltrierende Zellen ohne Unterstützung durch zirkulierende Lymphozyten oder zentralem Empfängerpool (Milz, Knochenmark) im Transplantat reifen und zu zytotoxischen Zellen werden. Die Reifung dieser Zellen wird durch lokale, d.h. von Zellen des Spenders,

produzierte Mediatoren stimuliert. Unter dem Einfluss von IL-1, IL-6, M-CSF und LTB<sub>4</sub> entstehen so zytotoxische T-Zellen und Immunglobulin produzierende Plasmazellen [41,77,127].

4. Während frühere Untersuchungen darauf hinwiesen, dass die Sensibilisierung des Empfängers nach Transplantation eines vaskularisierten Organs peripher (d.h. im Transplantat selbst) und nach Transplantation eines avaskulären Organs (Haut, Pankreasinseln) zentral (d.h. im drainierenden Lymphknoten und der Milz) erfolgt, zeigen neuere Experimente, dass bei vaskularisierten Transplantaten beide Pathomechanismen beteiligt sind [154,58,91]. Unter den "passenger leukocytes" migrieren vor allem dendritische Zellen innerhalb der ersten 3 Tage nach Transplantation aus dem Organ und sammeln sich in der Milz des Empfängers [40]. Die Migration erfolgt dabei sowohl über den Blutweg als auch über afferente Lymphbahnen [124,84]. Die dendritischen Zellen lagern sich in der Milz vor allem im Bereich der weißen Pulpa um CD4<sup>+</sup> T-Zellen an. Dass diese Migration für die Auslösung einer Abstoßungsreaktion wichtig ist, wird durch die Funktion der CD4<sup>+</sup> in der Transplantatimmunologie unterstrichen [16]. Durch die Untersuchung der Migration von <sup>111</sup>-Indium-markierten dendritischen Zellen und durch Auslösung einer Abstoßungsreaktion nach Toleranz durch Injektion von spenderspezifischen dendritischen Zellen konnte gezeigt werden, dass die entscheidende Rolle in der Sensibilisierung von Spenderzellen und nicht von dendritischen Zellen des Empfängers ausgeht [92,90]. Erste klinische Studien mit Organvorbehandlung (ex-vivo Perfusion bei Nierentransplantation) mittels monoklonaler Antikörper gegen dendritische Zellen resultierten in einer deutlich verminderten Abstoßungsrate [19].
5. Im zellulären Infiltrat nach Abstoßung von Transplantaten kommen überwiegend Makrophagen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen vor [155]. CD4<sup>+</sup> Zellen reagieren dabei mit Antigenen präsentiert durch MHC Klasse II und sind in der Lage durch Produktion von IL-2 ihre eigene Proliferation und Reifung zu unterhalten [31,143]. CD8<sup>+</sup> Zellen dagegen reagieren mit dem MHC Klasse I Molekül und benötigen zur Proliferation die Unterstützung von CD4<sup>+</sup> Zellen [106]. Die Behandlung von Empfängertieren mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu einer verzögerten

Abstoßung bzw. zur Induktion von Toleranz. Eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD8 T Zellen hingegen hat keinen Einfluss auf das Transplantatüberleben [65]. Natürliche Killer Zellen (NK), Lymphokin-aktivierte Killer Zellen (LAK) und präformierte zytotoxische Zellen (PCC) spielen im Rahmen der Transplantatabstoßung keine entscheidende Rolle. In vorbestrahlten Empfängern konnte trotz zellulären Infiltrats im Transplantat eine Abstoßungsreaktion nur durch die Transfusion von CD4+ Zellen erreicht werden [57]. Da CD4+ Zellen nur nach Kontakt mit Klasse II Molekülen aktiviert werden, können nur bestimmte Zellen im Transplantat eine Sensibilisierung auslösen. Dazu zählen dendritische Zellen, Makrophagen und mikrovaskuläre Endothelzellen, welche über eine große Zahl MHC Klasse II Moleküle an Ihrer Zelloberfläche verfügen oder durch Lymphokine zur Expression stimuliert werden können [14]. Die meisten Klasse II positiven Zellen im Transplantat zählen zu den "passenger leukocytes" und besitzen nur eine begrenzte Überlebenszeit [148]. Die Gefahr einer akuten Abstoßung ist deshalb auf wenige Wochen nach Transplantation beschränkt.

Die in den Schritten 1-5 aufgeführten Abläufe im Empfänger und Transplantat lassen sich nach dem bisherigen Stand der Forschung durch eine Vorbehandlung des Transplantates beeinflussen. Insbesondere Dünndarmtransplantate würden von einer Transplantatvorbehandlung profitieren, da damit sowohl eine Reduktion der Immunogenität erreicht, als auch die Gefahr der Graft-versus-Host Reaktion vermindert werden könnte.

### 1.1.2 Klinisch-historischer Überblick

Im klinischen Bereich begannen die ersten Versuche anfangs der sechziger Jahre. Detterling et al. transplantierten 1964 ein Ileumsegment von der Mutter auf ein Kind, und später ein Dünndarmkadavertransplantat auf ein zweites Kind. Beide Patienten verstarben wenige Stunden bzw. einige Tage nach der Operation. 1967 transplantierten Lillehei et al. einer 46-jährigen Frau einen kompletten Dünndarm einschließlich aufsteigendem Kolon. Diese Patientin verstarb wenige Stunden im Anschluss an die Operation. In den darauffolgenden Jahren wurden vereinzelt Dünndarmsegmente verschiedener Längen, bzw. ein kompletter Dünndarm transplantiert, alle ohne den gewünschten Erfolg. Die zu verzeichnenden Misserfolge der ersten Dünndarmtransplantationen zeigten, dass zwar die chirurgischen Schwierigkeiten als gelöst erachtet werden konnten, dass jedoch die weitaus größeren Probleme in den ablaufenden immunologischen Reaktionen zu erwarten waren. Im Vordergrund stand die bei fast allen Organtransplantationen auftretende "Host-versus-graft reaction" (HVGR). Zusätzlich kann es nach allogener DDTx durch mittransplantierte, immunkompetente Zellen zu Graft-versus-host reaction (GVHR) kommen, die mit einer GVHR nach Knochenmarkstransplantation vergleichbar ist.

Eine neue Ära in der humanen Transplantationsmedizin begann Mitte der achtziger Jahre mit der Einführung des Cyclosporin A (CyA). Erste Erfolge bei Herz- und Nierentransplantation ließen auf ein Gelingen auch bei der Dünndarmtransplantation hoffen. Cohen et al., Deltz et al., Grant et al. und Goulet et al. wagten erneut Dünndarmtransplantationen mit anschließender Immunsuppression mit Cyclosporin A. Aber auch sie bleiben weitgehend ohne Erfolg. Über die erste erfolgreiche Dünndarmtransplantation berichten 1989 Deltz et al.. Sie transplantierten einer 42-jährigen Frau ein 60 cm langes Segment aus dem Bereich des unteren Jejunums bzw. des oberen Ileums, das von der 46-jährigen Schwester der Patientin gespendet wurde. Zu Beginn der 90er Jahre wurde mit FK506 (Tacrolimus) ein neues Immunsuppressivum zur Behandlung von organtransplantierten Patienten zugelassen und auch zur Unterdrückung der Transplantatabstoßung bei Patienten nach Dünndarmtransplantation eingesetzt [158]. Die neuesten Daten der großen

Transplantationszentren zeigen bei der Auswertung der mit Tacrolimus behandelten Patienten von 1994 bis 1999, mit einem 4-Jahresüberleben des Transplantats von 65 %, ein deutlich besseres Ergebnis als unter Immunsuppression mit Cyclosporin A [1,50,110,46,105]. 77 % der Patienten sind nach der Transplantation von der HPN unabhängig und ihre Lebensqualität hat sich somit deutlich verbessert [49,131]. Dieser Erfolg rechtfertigt aus heutiger Sicht den Einsatz von Tacrolimus als Standardtherapie zur Immunsuppression von dünn darmtransplantierten Patienten.

Aktuelle klinische Studien untersuchen die Anwendung des Immunsuppressivums Mycophenolat Mofetil (MMF) [159]. Für eine abschließende Bewertung der Wirksamkeit in der Dünndarmtransplantation sind die veröffentlichten Ergebnisse noch nicht ausreichend.

### **1.1.3 Überblick ex-vivo Darmperfusion**

Die ersten Versuche mit ex-vivo perfundierten Organen wurden vor etwa 100 Jahren vorgenommen [35]. Gegenstand der meisten Untersuchungen waren zu dieser Zeit physiologische Fragestellungen, wie Perfusionsflussraten oder organspezifische Funktionen [75] und Stoffwechsel [102] der Organe. Eine der häufigsten Untersuchungen im Zusammenhang mit der ex-vivo Dünndarmperfusion waren diverse Resorptionsstudien gewesen [38,114,54,15,123]. So wurden anfänglich die Absorption der verschiedenen Nahrungsbestandteile [2,30,78,69,95,27,59] untersucht. Später beschäftigte man sich auch mit der enteralen Resorption von Arzneimitteln [136,111,133]. Als Versuchstiere dienten in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts größere Säugetiere, wie Katzen, Hunde [114,52] oder Schweine [17]. Die ersten Versuche mit einem Ratten-Dünndarm wurden 1949 von Fisher et al. publiziert [38]. Die Versuchsansätze unterschieden sich im wesentlichen durch die Verwendung von erythrozytenhaltigen [10,34,68,78,66,149] oder zellfreien Perfusionslösungen [63,130], durch die Verwendung von rezirkulierenden [78,67,66,83,149] oder nicht-rezirkulierenden [69] Perfusionssystemen und durch eine normotherme [99,149] oder hypotherme [76] Versuchsdurchführung. Insgesamt sind nur wenige rein methodische Arbeiten zur ex-

vivo Darmperfusion in der Fachliteratur zu finden [149,98,68,7]. Die wichtigsten methodischen Veröffentlichungen über die normotherme ex-vivo Perfusion mit erythrozytenhaltigen Perfusionslösungen, sind die Arbeiten von Windmüller und Späth, die Anfang der 70er Jahre publiziert wurden [163,164,165].

Die ersten ex-vivo Perfusionen vor dem Hintergrund einer Organvorbehandlung vor der Transplantation wurden beim Rattendünndarm erstmalig 1971 von Ruiz und Lillehei durchgeführt [132]. Bis heute folgten zahlreiche weitere Untersuchungen, bei denen verschiedenste ex-vivo Vorbehandlungsschemen getestet wurden [150,151,142,76].

## 1.2 Fragestellung

1. Ist eine zweistündige normotherme ex-vivo Perfusion des isolierten Dünndarms mit dem selbst entwickelten, computergesteuerten Perfusionssystem möglich, ohne dass der Darm histologisch erkennbaren Schaden nimmt?
2. Lässt sich die Vitalität des Organs auch während des Versuchs, über die Messung verschiedener physiologischer Parameter und spezielle Funktionstests nachweisen?
3. Welche der getesteten Hämodilutionslösungen und medikamentösen Zusätze ergeben die besten Resultate?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsmaterial

#### 2.1.1 Geräte

##### 2.1.1.1 Computersteuerung

Die Computersteuerung des Systems bot den Vorteil der automatischen Regulierung der Pumpengeschwindigkeit, nach dem jeweils vorherrschenden arteriellen Druck. Dadurch ergab sich die Möglichkeit eine druckkonstante Perfusion durchzuführen. Zusätzlich wurden verschiedene Messparameter kontinuierlich online aufgezeichnet.

Der Untersucher war durch die Automatisierung von einigen wichtigen Abläufen deutlich entlastet und konnte seine Aufmerksamkeit anderen Aufgaben während des Versuchs zuwenden. Die pro Zeitintervall erfasste Datenmenge war so ungleich größer und gleichzeitig wurden Objektivität und Reliabilität der erfassten Versuchsdaten deutlich erhöht.

##### 2.1.1.1.1 Hardware

Als Computer<sup>1</sup> diente ein handelsüblicher Personal Computer mit Cyrix<sup>®</sup> 6x86 133 MHz Prozessor, 24 MB RAM, 1,3 GB Festplatte, Windows 95<sup>®</sup> als Betriebssystem und einem 15"-Monitor.

Die verschiedenen Peripheriegeräte (Oxymeter, pH-Meter, Barometer, Thermometer, Pumpe) wurden an eine speziell angefertigte Schnittstelle angeschlossen. Dieses wiederum wurde mit der Messkarte<sup>2</sup> des Computers verbunden.

---

<sup>1</sup> Vobis Highscreen Computer, Vobis AG, Würselen, D

<sup>2</sup> Messkarte PCL-818 L, Spectra Computersysteme GmbH, Leinfelden-Echterdingen, D

### 2.1.1.1.2 Software

Labtech®Notebook pro<sup>1</sup>:

Mit dieser, speziell für den wissenschaftlichen und industriellen Gebrauch konzipierten Software, ist es möglich verschiedene analoge oder digitale Eingangssignale sofort und kontinuierlich weiter zu bearbeiten und aufzuzeichnen. Über Ausgangssignale können Peripheriegeräte, in Abhängigkeit zu einem Eingangssignal als Istwert und einem festgelegten Sollwert, im Sinne eines einfachen Regelkreises, gesteuert werden.

Das Programm besteht aus verschiedenen Unterprogrammen:

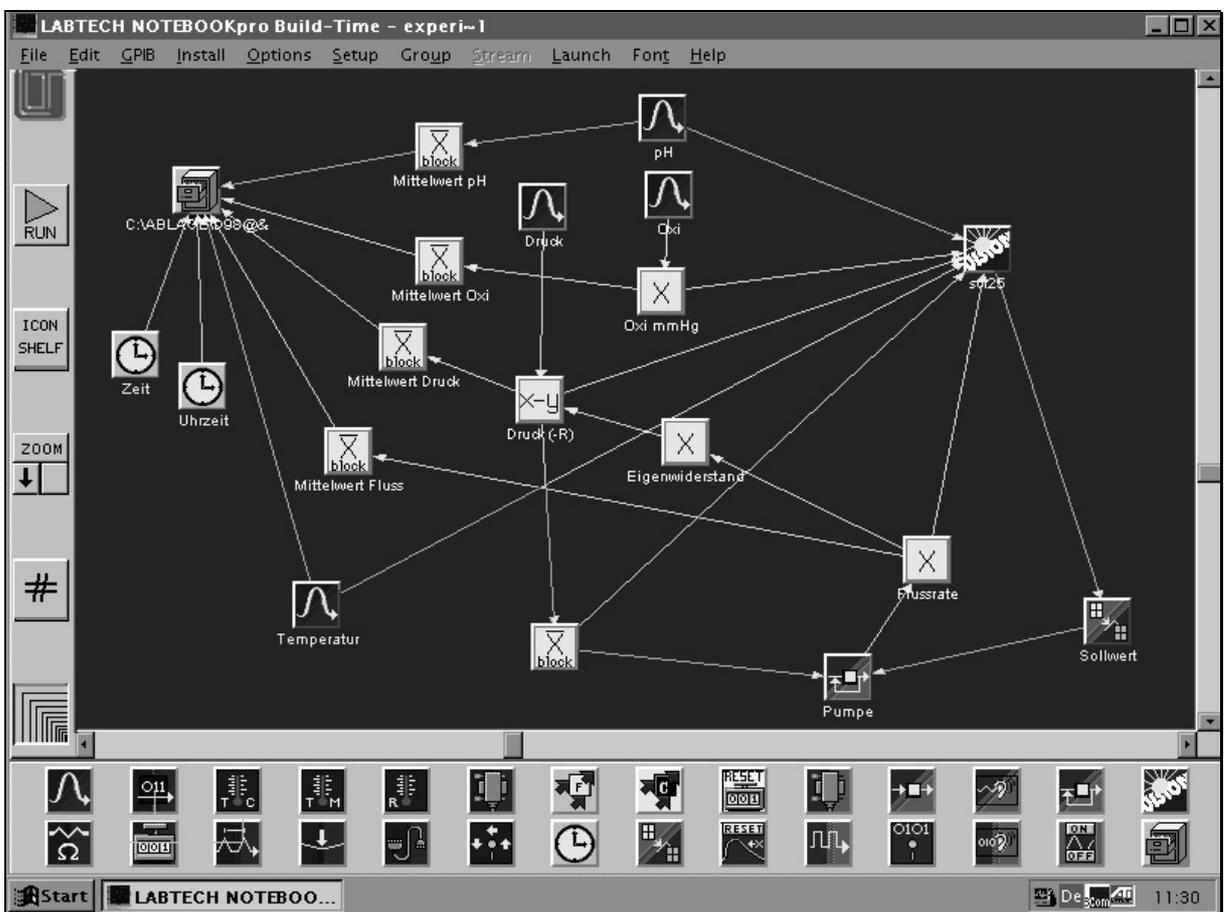


Abbildung 4: ICONview-Window

In dem Programm *Built-Time* können auf einer Benutzeroberfläche, dem sogenannten *ICONview-Window*, die verschiedenen Signaleingänge und Signalausgänge mit

<sup>1</sup> Steuerungssoftware Labtech®Notebook pro, Laboratory Technologies Corporation, Wilmington, USA

graphischen Symbolen, den *Block Icons* verknüpft werden. Über die weitere Verbindung der *Block Icons* entsteht ein Blockdiagramm des Bearbeitungsprozesses, das Setup (s.

Abbildung 4).

Durch Verknüpfung der *Input Block Icons* mit dem *Log Block Icon* kann das Eingangssignal aufgezeichnet werden und durch Verknüpfung mit einem *Display Block Icon* kann es während der Aufzeichnung zusätzlich auf dem Computermonitor graphisch oder numerisch dargestellt werden. Mit dem *Calculated Block Icon* lässt sich ein Signal über eine Vielzahl von mathematischen Operationen weiterberechnen. Der Signalausgang erfolgt über die *Output Block Icons*. Die Bearbeitungsfrequenz und andere Parameter aller Blocks lassen sich individuell festlegen.

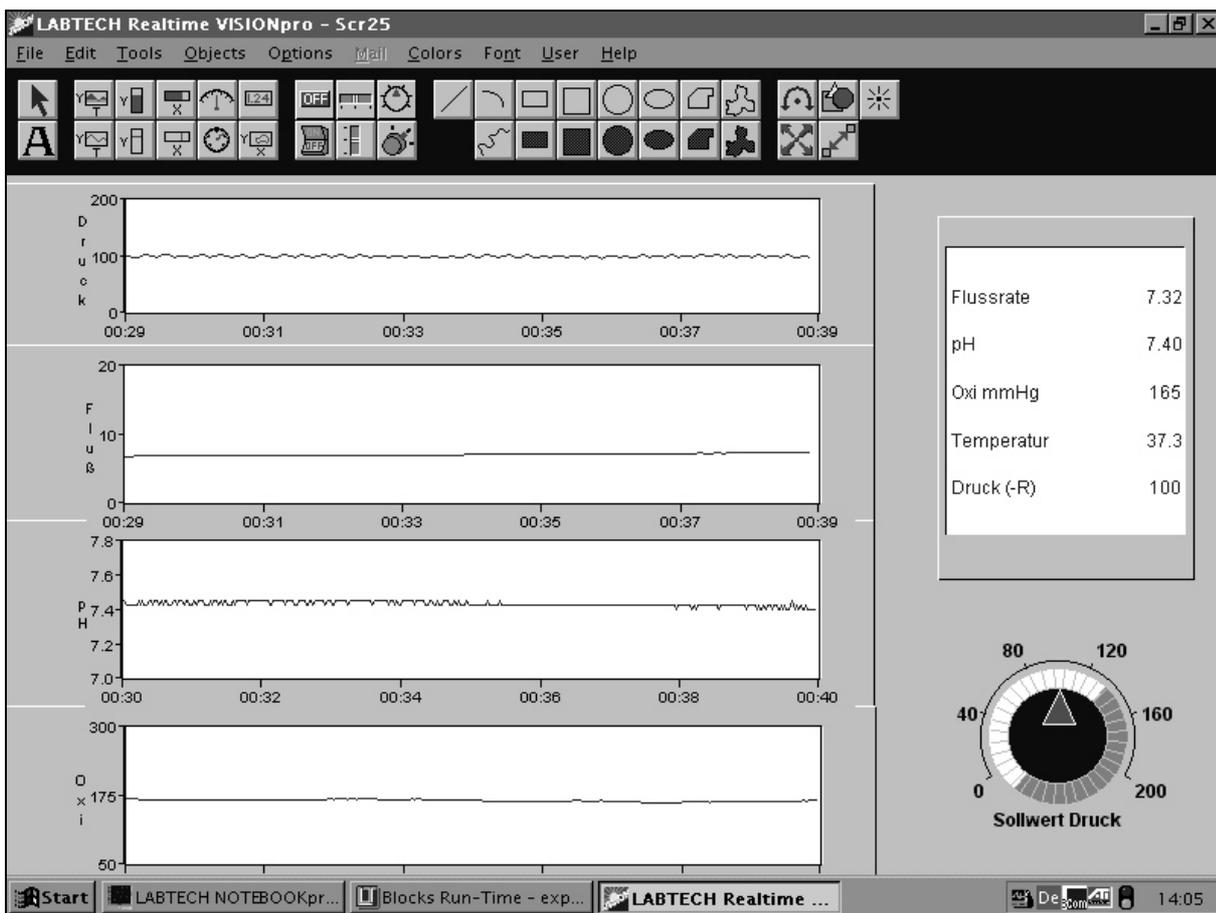
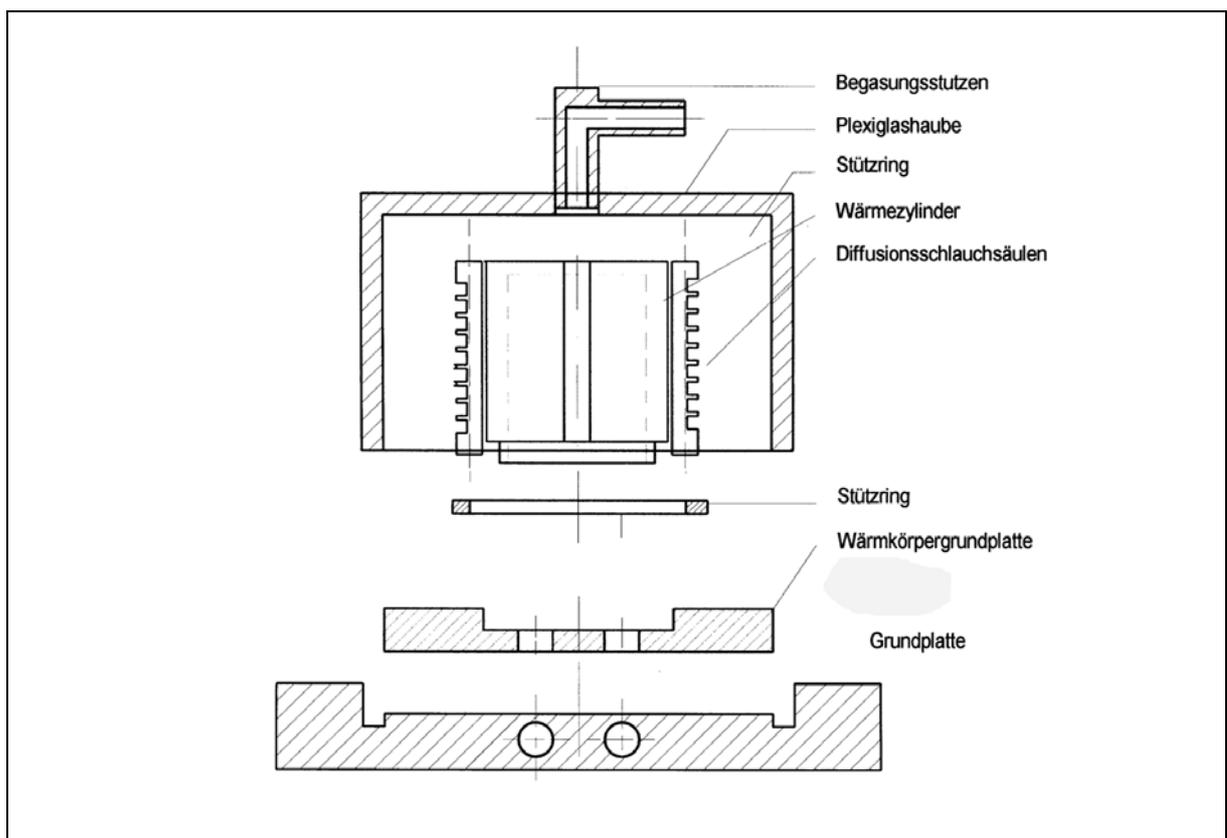


Abbildung 5: Realtime VISION-Window

Mit dem Programm *Run-Time* können *Built Time* Setups ausgeführt werden. Diejenigen Signale, die im Setup mit dem *Display Block Icon* verknüpft wurden, erscheinen im *Realtime VISION-Window* als Grafik oder als numerischer Wert in Echtzeit. Über das *Realtime VISION-Window* kann man während der Ausführung des Programms auf Steuerungsprozesse, zum Beispiel zur Veränderung des Sollwertes eines Regelkreises, Einfluss nehmen (s. Abbildung 5).

Die akquirierten Daten wurden alle 30 Sekunden im ASC II-Format auf der Festplatte gespeichert und wurden nach Beendigung des Versuchs, zur weiteren Bearbeitung ins Excel-Format transferiert und als Excel-File gespeichert.

### 2.1.1.2 Oxygenator<sup>1</sup>



**Abbildung 6: Querschnitt durch den Oxygenator**

<sup>1</sup> Oxygenator, Laborwerkstätte, Klinikum Großhadern, München, D

Der Oxygenator wurde speziell für unser Vorhaben von der Laborwerkstätte des Klinikums Großhadern konstruiert. An Materialien wurden Plexiglas und Aluminium verwendet. Er bestand im wesentlichen aus einer begasbaren Kammer aus Plexiglas, in deren Mitte sich ein beheizbarer Aluminiumzylinder befand. Zum Gasaustausch zwischen Perfusat und der begasbaren Kammer, wurde ein äußerst dünnwandiger, gasdurchlässiger Silikonschlauch<sup>1</sup> spiralförmig um den Aluminiumzylinder gewickelt. Für die ex-vivo Dünndarmperfusion erwiesen sich vier Umwickelungen als zweckmäßig, um eine ausreichende Aufsättigung mit Sauerstoff und gleichzeitig eine gute Steuerbarkeit des pH-Wertes, über die Beimischung von CO<sub>2</sub>-Gas, zu erreichen. Um die dünnwandigen Oxygenatorschläuche mit den robusteren Schläuchen des restlichen Perfusionssystems zu verbinden, wurden am Zu- und Abfluss des Oxygenators besondere Verbindungsstücke<sup>2</sup> verwendet. Die Steuerbarkeit von P<sub>O<sub>2</sub></sub> und des pH-Wertes, konnte durch das Bohren von fünf, ca.1 cm großen Löchern in die Wand der begasbaren Kammer, die je nach Anforderung geöffnet oder mit Klebestreifen verschlossen werden konnten, weiter verbessert werden. Ein weiterer Anschluss des Oxygenators war der Zu- und Ablauf der Warmwasserheizung im Aluminiumzylinder. Sie wurde über zwei PE-Schläuche mit Zu- und Ablauf der Druckpumpe des Wasserbecken-Heizsystems<sup>3</sup> verbunden und auf diese Weise mit dem 37°C warmen Beckenwasser betrieben. Das Sauerstoff- und Kohlendioxid-Gas wurde in einer Dosiereinrichtung gemischt und über einen ca. 2m langen Silikonschlauch dem Oxygenator zugeführt.

---

<sup>1</sup> Silikon-Kautschuk-Schlauch Typ 01302 ID 1.30 AD 1.34 mm, DETAKTA, Norderstedt, D

<sup>2</sup> Schlauchverbinder ISM 1.5 mm, Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, D

<sup>3</sup> Thermostat DC5, Gebrüder Haake GmbH, Karlsruhe, D

### 2.1.1.3 Rollerpumpe<sup>1</sup>

Als Pumpe für das Perfusionssystem wurde ein computersteuerbarer Pumpenantrieb mit einem achtzylindrigen Rollerpumpenkopf verwendet. Die Pumpe war über eine serielle Schnittstelle mit dem Steuerungscomputer verbunden. Die Pumpengeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit zum arteriellen Mitteldruck geregelt.

Die Schläuche<sup>2</sup> für die Rollerpumpe waren aus Silikon und wurden mit speziellen Verbindungstücken an das übrige System angeschlossen.

Die Pumpe wurde okkludierend betrieben. Das bedeutet, dass der Silikonschlauch durch die einzelnen Rollen der Pumpe vollständig komprimiert und so die komplette Blutsäule, ohne Verlust durch Reflux, transportiert wurde. Dieses Verfahren beinhaltet einen leicht pulsatilen Fluss und im Vergleich zum nicht-okkludierenden Betrieb eine gering erhöhte Hämolyserate.

### 2.1.1.4 Versuchsaufbau

Das Perfusionssystem bestand im wesentlichen aus einem Pumpen-Schlauchsystem, einem Oxygenator, einem beheizten Wasserbecken und einer Plexiglaseinheit mit dem Messblock, in dem die Messsonden angebracht waren (s. Abbildung 7).

Für das Schlauchsystem wurden Silikonschläuche<sup>3</sup> mit einem Innendurchmesser von 1,3 mm und einer Wandstärke von 0,9 mm verwendet. Sie hatten eine Länge von 104 cm und fassten ein Volumen von 5,52 ml.

Als Verbindungsstücke zwischen den Systemschläuchen und den Pumpenschläuchen, wurden die abgeschnittenen Spitzen eines Venenverweilkatheters<sup>4</sup> aus teflonbeschichteten Kunststoff benutzt (s. Abbildung 7: Verbindungstyp 1). Sonst wurden Luer-Lock-Verbindungen eingesetzt. Als männliche Verbindungsteile wurden die Enden von Perfusorleitungen<sup>1</sup> oder von Infusionsschläuchen verwendet. Als weibliche

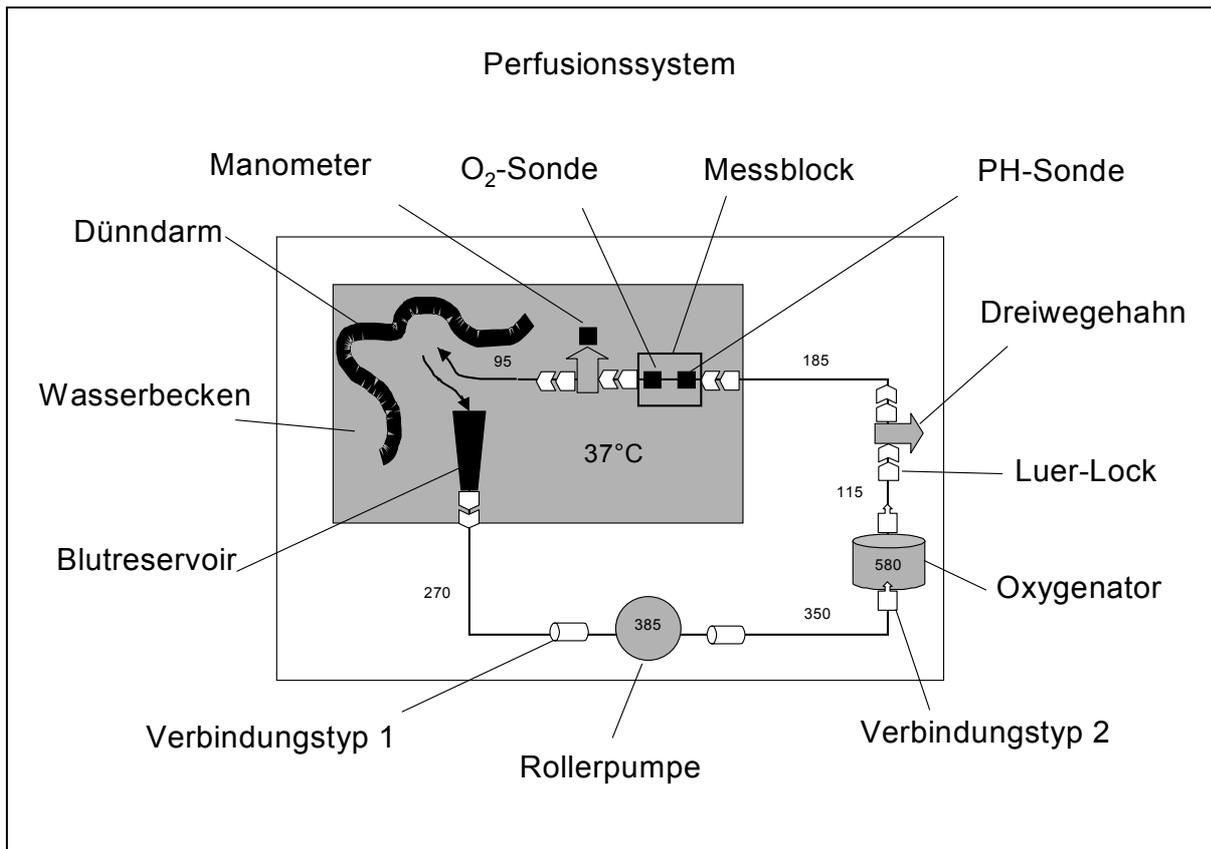
---

<sup>1</sup> Schlauchpumpenantrieb MCP + Pumpenkopf CA4, Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, D

<sup>2</sup> Silikonpumpenschlauch ID 1.3 mm, Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, D

<sup>3</sup> Silikonschlauch ID 1.3 Wst 0.9 mm, Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, D

<sup>4</sup> Vasculon Plus 16G ID1.8, Ohmeda GmbH, Erlangen, D



**Abbildung 7: Aufbau des Perfusionssystems in einer Schemazeichnung; Zahlenangaben: Länge der Schlauchabschnitte in mm**

Verbindungssteile wurden Venenverweilkatheter<sup>2</sup> ohne Stahlkanüle und mit abgeschnittenen Spitzen benützt. Um die dünnwandigen Oxygenatorschläuche mit den robusteren Schläuchen des restlichen Perfusionssystems zu verbinden, wurden am Zu- und Abfluss des Oxygenators besondere Verbindungsstücke<sup>3</sup> verwendet (s. Abbildung 7: Verbindungstyp 2).

Das Wasserbecken<sup>4</sup> aus Plexiglas, war 500 x 200 x 210 mm (LxBxH) groß und mit 14,7 l entionisiertem Wasser gefüllt. Das Becken wurde mit einem Thermostat<sup>5</sup> beheizt.

Die Plexiglaseinheit<sup>1</sup> bestand aus dem Messblock, dem Probenhalter und dem Blutreservoir, die alle auf einer Grundplatte aus Plexiglas montiert waren (s.

<sup>1</sup> Verbindungsstücke, Mediflex-PVC Linie, pvb Medizintechnik GmbH, Kirchseon, D

<sup>2</sup> Vasculon Plus 16G ID 1.8, Ohmeda GmbH, Erlangen, D

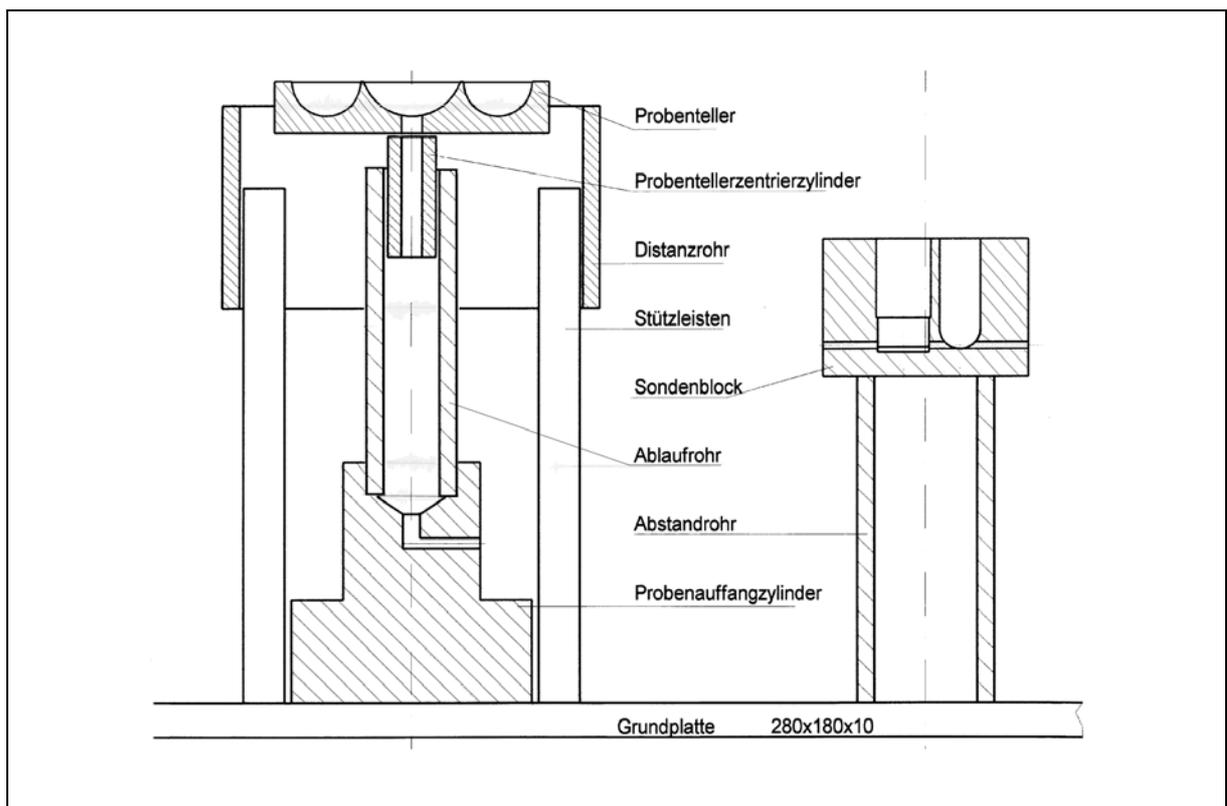
<sup>3</sup> Schlauchverbinder ISM ID 1.5, Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, D

<sup>4</sup> Wasserbecken, Laborwerkstätte, Klinikum Großhadern, München, D

<sup>5</sup> Thermostat DC5, Gebrüder Haake GmbH, Karlsruhe, D

Abbildung 8). Der Probeteller hatte eine zentrale Bohrung, über die das venöse Blut aus der Pfortader ablaufen konnte. Um zu verhindern, dass Mukus aus den offenen Darmenden in das Blutreservoir gelangt, wurden die Darmenden aus dem Probeteller ausgelagert und in zwei Auffangbehältnisse gehängt. Zusätzlich waren der Darm und der Ablauf zum Blutreservoir durch einen Steg getrennt. Die über den Steg ziehenden Mesenterialgefäße wurden in ihrem Verlauf nicht komprimiert, so dass durch diese Spezialkonstruktion des Probenablagetellers eine sichere Trennung von Darmsekret und Perfusat gewährleistet wurde, ohne die Perfusion selbst zu behindern (s. Abbildung 1).

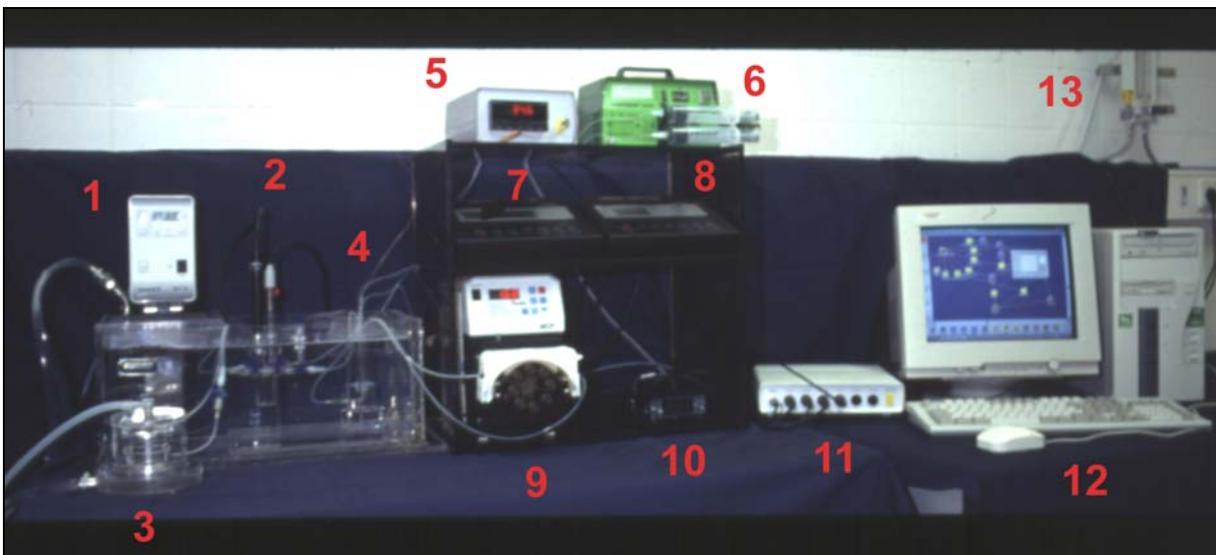
Das Blutreservoir fasste ein Volumen von 18 ml und lief unten konisch zusammen. Die Verbindung zum Schlauchsystem Auslass, wurde mit Luer-Lock-Verbindungen (s.o.) hergestellt.



**Abbildung 8: Querschnitt durch die Plexiglaseinheit; Die Einheit bestand aus Probeteller, Blutreservoir (Ablaufrohr) und Messblock (Sondenblock)**

<sup>1</sup> Plexiglaseinheit, Laborwerkstätte, Klinikum Großhadern, München, D

Der Messblock war so konstruiert, dass das Perfusatblut in einer großen Fläche mit den Sonden in Kontakt treten konnte um eine ausreichende Messgenauigkeit zu erzielen. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die Hämolyse durch Engstellen oder Flussrichtungsänderungen und die dabei entstehenden Turbulenzen, im Bereich des Messblocks möglichst gering gehalten wurden. Der Sondenblock wurde über Quetschdichtungsringe<sup>1</sup> aus Silikon an den oberen Enden der zwei Bohrungen für die pH- und Sauerstoffsonde abgedichtet. Die Verbindung zum Schlauchsystem am Zu- und Abfluss, wurde mit Luer-Lock-Verbindungen (s.o.) hergestellt.



**Abbildung 9: Versuchsaufbau: 1 Beckenheizung, 2 Messsonden, 3 Oxygenator, 4 Probenteller, 5 Thermometer, 6 Perfusor, 7 pH-Messgerät, 8 Sauerstoffmessgerät, 9 Rollerpumpe, 10 Druckmessgerät, 11 Schnittstelle, 12 Steuerungscomputer, 13 Gasregulierung (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>)**

---

<sup>1</sup> Dichtungsringe, Laborwerkstätte, Klinikum Großhadern, München, D

### 2.1.1.5 Perfusor<sup>1</sup>

Noradrenalin und Bikarbonat wurden kontinuierlich über Perfusor substituiert. Um für eine möglichst gleichmäßige Abgabe zu sorgen, kamen besonders kleinlumige Schläuche<sup>2</sup> zum Einsatz. Sie wurden über Kanülen<sup>3</sup> mit den Perfusorspritzen<sup>4</sup> verbunden. Die beiden Schläuche wurden im Blutreservoir etwa 5 mm in Ausgangsbohrung am Boden des Gefäßes, also direkt in die Ausflusstrombahn gelegt.

### 2.1.1.6 pH-Messgerät<sup>5</sup>

Zur kontinuierlichen, potentiometrischen Messung des pH-Wertes wurde ein Hochleistungs-pH-mV-Meter, in Kombination mit einer Redox-Einstabmesskette verwendet. Das Gerät wurde vor jedem Versuch mit drei Standard-Pufferlösungen<sup>6</sup> (pH 4,01 – 6,87 – 9,18), unter Berücksichtigung der Zimmertemperatur kalibriert. Während des Betriebs wurde der vom Temperaturmessgerät (s.: Kap 2.1.1.8) ermittelte Wert, zur Berechnung der Temperaturkompensation, manuell eingegeben.

Laut Herstellerangabe beträgt die Messgenauigkeit des so betriebenen Gerätes 0,01 pH. Zusätzlich wurden mehrmals Blutproben zur exakten Bestimmung des pH-Wertes an einem medizinischen Blutgasanalyse-Gerät<sup>7</sup> abgenommen und mit den vom pH-Meter gemessenen Werten verglichen. Die in der Korrelation festgestellte Übereinstimmung zwischen den Messwerten war so gut ( $r^2=0,97$ ), dass auf Korrekturberechnungen verzichtet werden konnte.

Das pH-Messgerät besaß eine serielle Schnittstelle. Es konnte so zur ständigen Aufzeichnung des aktuellen pH-Wertes mit dem Steuerungscomputer verbunden werden. Nach jedem Einsatz wurde die Sonde sorgfältig unter fließendem Wasser

---

<sup>1</sup> Perfusor Secura, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>2</sup> Polythenschlauch 0.28 ID 0.61 AD, Portex Ltd, Hythe, UK

<sup>3</sup> Kanüle Microlance<sup>®</sup>3, Becton Dickinson, Fraga, SP

<sup>4</sup> Perfusorspritze 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>5</sup> pH-mV-Meter 540 GLP, WTW GmbH, Weilheim, D

<sup>6</sup> Standardpufferlösungen (DIN 19266) PL4 PL7 PL9, WTW GmbH, Weilheim, D

<sup>7</sup> Radiometer ABL 555, Radiometer Medical A/S, Bronshoj, DK

gereinigt und danach mit entionisiertem Wasser gespült. Anschließend wurde die Sonde in 3 Mol KCl-Lösung gelagert.

### 2.1.1.7 Sauerstoffmessgerät<sup>1</sup>

Die Menge des im Blut gelösten Sauerstoffs wurde amperemetratisch mit einer membranbedeckten Dreielektrodensonde, einer modifizierten Sonde nach Clark, bestimmt.

Das Gerät wurde vor jedem Versuch in einem speziellen Kalibriergefäß<sup>2</sup> an Raumluft unter Wasserdampfsättigung kalibriert. Zur automatischen Temperaturkompensation war in der Sonde ein Thermometer (Präzision  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ) integriert. Ebenso wurde der aktuelle Luftdruck mit einem eingebauten Drucksensor automatisch gemessen.

Da die angegebene Einheit [mg/l] für die in der Flüssigkeit gelöste Menge Sauerstoff aus medizinischer Sicht ungünstig war, wurde sie in eine andere Einheit [mmHg] umgerechnet. Unter Berücksichtigung der linearen Beziehung zwischen gelöstem Gasvolumen in einem bestimmten Volumen Wasser und dem Partialdruck des Gases in der überstehenden Atmosphäre bei einer bestimmten Temperatur (Henry-Gesetz, s. Gleichung 1), konnte eine Eichgerade erstellt werden.

#### Gleichung 1: Henry-Gesetz

$$L = \alpha \cdot \frac{p}{p_N}$$

$L$	Gelöstes Gasvolumen [ml O <sub>2</sub> /l]
$\alpha$	Löslichkeitskoeffizient [ml O <sub>2</sub> /l·mmHg]
$p$	Luftdruck [mmHg]
$p_N$	Normaldruck [mmHg]

---

<sup>1</sup> Oxymeter Oxi 538, Sauerstoffsensor CelloX 325, WTW GmbH, Weilheim

<sup>2</sup> Kalibriergefäß OxiCal<sup>®</sup>-ST, WTW GmbH, Weilheim

Hierfür wurden die vom Messgerät bestimmten Sauerstoffmassenkonzentrationen gegen die Partialdrücke, die von einem medizinischen Gas-Check-Gerät<sup>1</sup> gemessen wurden, aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient war hoch genug ( $r^2 = 0,96$ ), um die Gleichung der Eichgeraden zur Umrechnung der Einheit mg/l in mmHg zu verwenden. Diese Operation wurde vom Softwareprogramm *Nb-Pro*, nach entsprechender Programmierung, automatisch für jeden gemessenen Wert durchgeführt.

Die Genauigkeit der Messung ist zusätzlich von der Anströmungsgeschwindigkeit abhängig. Eigene Untersuchungen haben allerdings ergeben, dass in unserem Versuchsaufbau ein Fluss von mehr als 1 ml/min ausreichend war, um ein Maximum an Präzision zu erreichen.

Nach jedem Einsatz wurde die Sonde sorgfältig unter fließendem Wasser gereinigt und danach mit entionisiertem Wasser gespült.

#### 2.1.1.8 Temperaturmessgerät<sup>2</sup>

Die Temperatur wurde mit einem Widerstandsthermometer gemessen und über eine serielle Schnittstelle kontinuierlich an den Steuerungscomputer weitergegeben. Die Messsonde befand sich im Wasserbecken.

#### 2.1.1.9 Druckmessgerät<sup>3</sup>

Der Sensor für die Druckmessung wurde im letzten Abschnitt des Schlauchsystems, kurz vor der Verbindung zum Organ, in Parallelschaltung angebracht (s. Abbildung 7). Das Gerät wurde vor jedem Versuch geeicht. Da der Sensor tiefer als das Organ lag, wurde der hydrostatische Druck bei der Einstellung des Nullwertes abgezogen. Die Amplitude wurde mit Hilfe eines Drucksimulators<sup>4</sup> eingestellt. Über die serielle

---

<sup>1</sup> Radiometer ABL 555, Radiometer Medical A/S, Bronshøj, DK

<sup>2</sup> Thermometer INFCT, Newport Electronics, Deckenpfronn, D

<sup>3</sup> Barometer Direct BP 1, Bilaney, Düsseldorf, D

<sup>4</sup> Cobe Pressure Simulator, Cobe, Lakewood, Colorado, USA

Schnittstelle wurde das Gerät, zur ständigen Aufzeichnung des aktuellen Perfusionsdrucks mit dem Computer verbunden. Der gemessene Wert wurde gleichzeitig für die Steuerung der Pumpe verwendet. Der flussabhängige Eigenwiderstand des Perfusionssystems, wurde nach entsprechender Programmierung der Steuerungssoftware automatisch subtrahiert.

## **2.1.2 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Lewis-Ratten (Lew/Cr1BR)<sup>1</sup>.

Durch die Verwendung des gleichen Inzuchtstammes als Darmspender, sowie als Blutspender für das Perfusat, wurde somit ein isogenes Modell für die ex-vivo Perfusion geschaffen.

Die Tiere für die Darmentnahme wogen zwischen 180 und 220 Gramm, die Tiere für die Blutspende waren ausgewachsen und wogen mehr als 250 Gramm.

Die Verwendung der Ratten wurde von der Regierung von Oberbayern über den Tierversuchsantrag AK 211-2531.2-8/98 genehmigt.

### **2.1.2.1 Versuchstierhaltung**

Die Versuchstiere wurden in einem vollklimatisierten Tierstall (22°C, 65 % Luftfeuchtigkeit) mit Beleuchtungsautomatik, im 12-stündigem Tag-, Nachtrhythmus, in Polycarbonatkäfigen (42 x 26 x 15 cm), die mit staubfreien Weichholzgranulat ausgelegt waren, gehalten. Die Tiere erhielten Wasser und pelletiertes Trockenfutter für Versuchstiere ad libitum.

---

<sup>1</sup> Lewis-Ratten, Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, D

### 2.1.3 Perfusionsflüssigkeit

Als Perfusat wurde hämodilutiertes isogenes Rattenvollblut verwendet.

Das zunächst gewonnene Blutvolumen betrug ca. 12-16 ml, der Hämatokrit 42 - 46 %.

Nach exakter Bestimmung des Hämatokrits über die Zentrifugationsmethode, erfolgte die Verdünnung des Blutes entweder mit 0,9 %iger Kochsalzlösung, die zusätzlich 24mmol/l NaHCO<sub>3</sub> enthielt oder mit Krebspuffer auf einen Hämatokrit von 30 %.

**Tabelle 2: Krebspuffer**

	Volumen / Menge	Endkonzentration
Vollelektrolytlösung <sup>1</sup> ( Na <sup>+</sup> 140, K <sup>+</sup> 4, Ca <sup>++</sup> 2,5, Mg <sup>++</sup> 1, Cl <sup>-</sup> 106, Laktat <sup>-</sup> 45 mM )	87,5 ml	Na <sup>+</sup> 123, K <sup>+</sup> 3,5, Ca <sup>++</sup> 2,2, Mg <sup>++</sup> 0,9, Cl <sup>-</sup> 93, Laktat <sup>-</sup> 39 mM
Human-Albumin 20% <sup>2</sup>	10 ml	2 g/dl
NaHCO <sub>3</sub> 8,4 % <sup>3</sup>	2,4 ml	24 mmol/L
Dextrose <sup>4</sup>	200 mg	200 mg/dl
Taurocholsäure <sup>5</sup>	7,3 mg	7,3 mg/dl
MgSO <sub>4</sub> <sup>6</sup>	29,6 mg	29,6 mg/dl
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>7</sup>	13,6 mg	13,6 mg/dl
NaOH, HCL	Nach Bedarf	pH 7,40
Σ	100 ml	

<sup>1</sup> Sterofundin®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>2</sup> Human-Albumin 20% Behring salzarm, Centeon Pharma GmbH, Marburg (Lahn), D

<sup>3</sup> Natriumhydrogencarbonat 8,4%, Fresenius AG, Abt. Marktbereich Klinik, Bad Homburg v. d. H. , D

<sup>4</sup> Dextrose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

<sup>5</sup> Taurocholic acid, ICN Biochemicals Inc., Aurora, Ohio, USA

<sup>6</sup> MgSO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

<sup>7</sup> K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

**Tabelle 3: NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer**

	Volumen	Endkonzentration
NaHCO <sub>3</sub> 8,4 % <sup>1</sup>	2,4 ml	24 mmol/L
NaCl 0,9 % <sup>2</sup>	97,6 ml	150 mmol/L
Σ	100 ml	

### 2.1.4 Medikamentöse Zusätze

- **Glutaminhaltige Darmspüllösung:**

Das von uns verwendete Präparat Dipeptamin<sup>®</sup> enthält 20 g N(2)-L-Alanyl-L-Glutamin (entspricht 8,20 g L-Alanin, 13,45 g L-Glutamin) pro 100 ml. Die theoretische Osmolarität beträgt 921 mosm/l, die Titrationsazidität: 90-105 mmol NaOH/l und der pH-Wert 5,4-6,0.

Zur Herstellung von 100 ml einer isotonen und pH-neutralen Lösung wurden folgende weitere Zusätze verwendet:

**Tabelle 4: Darmspüllösung**

	Volumen	Endkonzentration
Dipeptamin <sup>®3</sup>	10 ml	13,45 mg L-Glutamin/ml 8,2 mg L-Alanin/ml
NaOH 10M <sup>4</sup>	0,1 ml	
Glucose 5% <sup>5</sup>	75 ml	37,5 mg Glucose/ml
Aqua dest <sup>1</sup>	15 ml	
Σ	100 ml	

<sup>1</sup> Natriumhydrogencarbonat 8,4%, Fresenius AG, Abt. Marktbereich Klinik, Bad Homburg v. d. H., D

<sup>2</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>3</sup> Dipeptamin<sup>®</sup>, Fresenius AG, Abt. Marktbereich Klinik, Bad Homburg v. d. H., D

<sup>4</sup> NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, D

<sup>5</sup> Glucose 5%, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, D

- **Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)**

Das während der Perfusion entstandene Laktat wurde durch den kontinuierlichen Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> abgepuffert. Die benötigte Menge wurde empirisch ermittelt und lag bei 10,2 mg/h, die in einem Zeitvolumen von 0,3 ml/h über den Perfusor hinzugefügt wurden. Es war so über die gesamte Perfusion hindurch möglich, die Bikarbonatkonzentration und den pH-Wert des Perfusats im Normbereich zu halten. Zur Herstellung von 100 ml Lösung wurde folgende Verdünnung gewählt:

**Tabelle 5: Natriumbikarbonat-Lösung**

	Volumen	Endkonzentration
NaHCO <sub>3</sub> 8,4 % <sup>2</sup>	40 ml	3,36 %
NaCl 0,9 % <sup>3</sup>	60 ml	
Σ	100 ml	

- **Noradrenalin**

Der isoliert perfundierte Dünndarm zeigt bereits nach wenigen Minuten Zeichen einer gestörten Gefäßtonisierung. Aufgrund der nicht mehr vorhandenen noradrenergen Innervation des Darmes ist der Gefäßwiderstand deutlich herabgesetzt. Deutlich wird das, durch eine unphysiologisch hohe Perfusionsflussrate, entzündlich-hyperämischer Aussehen des Darmes und ausgedehnten Nekrosen der Mukosa, bedingt durch ein erhöhtes Blutsuntvolumen. Hinzu kommt eine gesteigerte Mukussekretion in das Darmlumen und eine deutlich sichtbare Hypermotilität.

Um diese, durch die Denervierung des Darms entstandenen Störungen auszugleichen, wurde Noradrenalin kontinuierlich über Perfusor substituiert. Kriterium für den Beginn der Substitution war ein Anstieg der Perfusionsflussrate auf mehr als 4 ml/min.

---

<sup>1</sup> Aqua dest, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>2</sup> Natriumhydrogencarbonat 8,4%, Fresenius AG, Bad Homburg v. d. H., D

<sup>3</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Die benötigte Menge zur Stabilisierung der Flussrate lag zwischen 70 und 166 ng Noradrenalin pro Minute.

Durch den Zusatz von Noradrenalin über Perfusor ließ sich eine ausreichende Tonisierung der Gefäße wiederherstellen, die Perfusionsflussrate war gut steuerbar. Hyperämie, Hypersekretion und Hypermotilität traten nicht, oder im weitaus geringeren Maße auf. Auch aus histologischer Sicht erwies sich der Zusatz von Noradrenalin von Vorteil.

Zur Herstellung von 100ml Lösung wurde folgende Verdünnung gewählt:

**Tabelle 6: Noradrenalin-Lösung**

	Volumen	Endkonzentration
Noradrenalin <sup>1</sup>	4 ml	40 µg/ml
NaCl 0,9 % <sup>2</sup>	96 ml	
Σ	100 ml	

---

<sup>1</sup> Arterenol®, Hoechst Aktiengesellschaft, Hoechst Marion Roussel Deutschland, Bad Soden, D

<sup>2</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

### 2.1.5 Gasförmige Zusätze

- **Sauerstoff<sup>1</sup>**

Da der Luftsauerstoff zur Oxygenierung des Perfusats im Oxygenator nicht ausreichend war, musste es mit Sauerstoff begast werden. Ziel war hierbei ein arterieller  $P_{O_2}$  von 200 mmHg. Das benötigte Zeitvolumen an Sauerstoff-Gas lag bei 2-6 l/min und wurde an einer Dosiereinrichtung mit Kohlendioxid-Gas im Verhältnis von ca. 95:5 gemischt.

- **Kohlendioxid<sup>2</sup>**

Um den pH-Wert des Perfusatbluts konstant halten zu können, musste neben dem Serumbikarbonat auch der  $P_{CO_2}$  im Normbereich gehalten werden. Da  $HCO_3$  kontinuierlich über Perfusor zugeführt wurde (s.o.), diente die Zufuhr von Kohlendioxid-Gas vor allem zur Feinabstimmung des pH-Wertes. Das durchschnittliche Mischungsverhältnis von Kohlendioxid mit Sauerstoff von 5:95, wurde während eines Versuchs öfters geringgradig verändert, um kurzfristig Korrekturen am pH-Wert vornehmen zu können. Das benötigte Zeitvolumen an Kohlendioxid-Gas lag somit bei 0,1-0,3 l/min

---

<sup>1</sup> Sauerstoff, Linde AG, Höllriegelskreuth, D

<sup>2</sup> Kohlendioxid, Linde AG, Höllriegelskreuth, D

## 2.1.6 Versuchsgruppen

**Tabelle 7: Versuchsgruppen**

Gruppe 1	Hämodilution mit NaCl/HCO <sub>3</sub> -Puffer
Gruppe 2	Hämodilution mit Krebs-Puffer
Gruppe 3	Hämodilution mit Krebs-Puffer und Substitution von Noradrenalin

## 2.2 Untersuchungsmethoden

### 2.2.1 Versuchsvorbereitungen

Zu den Versuchsvorbereitungen gehörte die Blutentnahme und Herstellung der Perfusionsflüssigkeit, die Organexplantation und die Einrichtung des Perfusionssystems.

#### 2.2.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme bei einer Spenderratte<sup>1</sup> mit einem Gewicht von 250 - 400 g erfolgte kurz vor Entnahme des Darmes. Zur Narkose wurden die Tiere in einem ausreichend großen Glasgefäß mit hochgereinigtem Diethylether<sup>2</sup> vorbetäubt. Danach injizierten wir 0,05 mg/100g KG 3,6 %ige Chloralhydratlösung<sup>3</sup> schmerzfrei, während der Ätherkurznarkose. Vor der Operation wurden die Versuchstiere rasiert<sup>4</sup> und dann auf dem OP-Tisch mit Klebestreifen, auf dem Rücken liegend, fixiert. Die Eröffnung des Abdomens erfolgt mittels Längslaparotomie und unter Verwendung von mikrochirurgischen Instrumentarium<sup>5,6</sup> und herkömmlichen Wattestäbchen.

Nach Auslagerung des Darmkonvoluts, wurde die Aorta abdominalis kurz oberhalb der Bifurkation im Retroperitoneum freipräpariert und abgeklemmt. Mit einem Venenverweilkatheter<sup>7</sup> wurde die gestaute Arterie punktiert und das Blut mit einer 300IE Heparin<sup>8</sup> enthaltenden 20ml Spritze<sup>9</sup> vorsichtig aspiriert, bis das Tier eine Asystolie entwickelte und daraufhin in der Narkose verstarb.

Das so gewonnene Blutvolumen aus ein bis zwei Ratten, lag zwischen 12 und 16 ml.

---

<sup>1</sup> Lewis-Ratten, Charles River Wiga, GmbH, Sulzfeld, D

<sup>2</sup> Äther zur Narkose ASID®, ASID BONZ GmbH, Böblingen, D

<sup>3</sup> Chloralhydrat 3,6%, Klinikapotheke Klinikum Innenstadt, München, D

<sup>4</sup> Langhaarschneider Elektra II, Aesculap, Tuttlingen, D

<sup>5</sup> Mikrochirurgisches Instrumentarium, Aesculap AG, Tuttlingen, D

<sup>6</sup> Mikrochirurgisches Instrumentarium, Medicon eG, Tuttlingen, D

<sup>7</sup> Vialon-Angiocath 20G (rosa) Insyte-W, Beckton Dickinson, Heidelberg, D

<sup>8</sup> Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm, D

<sup>9</sup> 20 ml Spritze, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

### 2.2.1.2 Organentnahme

Die mesenterialen Gefäße reagieren empfindlich mit einer Vasokonstriktion auf jegliche Art von Manipulation. Diese kann bereits während der Explantation zur Ischämie und damit zur Schädigung der Darmmukosa führen. Die schonende Präparation des Darmes in situ ist daher Grundvoraussetzung für das Gelingen einer ex-vivo Darmperfusion. Das im folgenden beschriebene Verfahren ist das Ergebnis einer Vielzahl von Versuchen und hat sich vom zeitlichen Ablauf her und vom Zustand des Darmes nach der Explantation als besonders günstig erwiesen.

Vom Prinzip her entspricht die Präparation der einer Explantation für eine Dünndarmtransplantation, wie sie aus der Literatur bekannt ist [62]. Es wurden jedoch einige wichtige Arbeitsschritte modifiziert, so dass deshalb die gesamte Prozedur ausführlich beschrieben werden muss:

Als Spendertiere<sup>1</sup> wurden männliche Lewis Ratten verwendet. Die Ratten blieben präoperativ 24 Stunden nüchtern und hatten ein Gewicht zwischen 180 und 220 Gramm.

Zur Narkose wurden die Tiere in einem ausreichend großen Glasgefäß mit hochgereinigtem Diethylether<sup>2</sup> vorbetäubt. Danach injizierten wir 0,05 mg/100g KG 3,6 %ige Chloralhydratlösung<sup>3</sup> während der Ätherkurznarkose und nach ca. 30 min. Operationszeit noch einmal die Hälfte der Anfangsdosis zur Aufrechterhaltung der Narkose.

Vor der Operation wurden die Versuchstiere rasiert<sup>4</sup> und dann auf dem OP-Tisch mit Klebestreifen, auf dem Rücken liegend, fixiert.

Die Explantation des Dünndarms erfolgte unter Verwendung von Lupenbrillen<sup>5</sup>, speziellem mikrochirurgischen Instrumentarium<sup>6,7</sup> und herkömmlichen Wattestäbchen.

---

<sup>1</sup> Ratten, Charles River Wiga, GmbH, Sulzfeld, D

<sup>2</sup> Diethylether, Hoechst Aktiengesellschaft, Hoechst Marion Roussel Deutschland, Bad Soden am Ts., D

<sup>3</sup> Chloralhydrat 3,6%, Klinikapotheke Klinikum Innenstadt, München, D

<sup>4</sup> Langhaarschneider Elektra II, Aesculap, Tuttlingen, D

<sup>5</sup> Lupenbrille Vergrößerung 2,0-fach, Eschenbach, München, D

<sup>6</sup> Mikrochirurgisches Instrumentarium, Medicon, Tuttlingen, D

<sup>7</sup> Mikrochirurgisches Instrumentarium, Aesculap, Tuttlingen, D

Die Eröffnung des Abdomens fand über eine mediane Laparatomie statt. Zunächst wurde das gesamte Darmkonvolut auf die rechte Seite geschlagen und mit einer feuchten<sup>1</sup> Kompresse<sup>2</sup> bedeckt. Die regelmäßig mit dem Colon descendens verwachsene Dünndarmschlinge wurde scharf vom Colon abgesetzt und gleichzeitig das Meso des Colon descendens von der A. colica sinistra, bis zur A. colica media und dann weiter bis zur A. colica dextra längs durchtrennt. Die übrigen ilio-jejunalen Gefäße, sowie die Aa. colicae media et dextra wurden doppelt ligiert<sup>3</sup> und durchtrennt. Von der linken Seite erfolgte jetzt die Freilegung der proximalen Anteile der A. mesenterica superior aus dem retroperitonealen Bindegewebe bis zu ihrem Abgang aus der Aorta abdominalis. Von dort aus wurde dann das Bindegewebe parallel zur Aorta bis zur V. portae durchschnitten. Die V. lienalis und die A. et V. mesenterica media wurden doppelt ligiert<sup>3</sup> und durchtrennt.

Das Caecum wurde über den gesamten Dünndarm nach links geschlagen, so dass die A. und V. mesenterica superior im gesamten Verlauf von der Radix bis zum Caecum dargestellt werden konnte.

Nach doppelter Ligatur<sup>3</sup> und Durchtrennung der iliocaecalen Gefäße, wurde ein, von der Gefäßversorgung günstig erscheinendes, zwischen 10 und 12 cm langes und proximal im Jejunum gelegenes Segment ausgewählt. Nachdem die beiden, zwischen den ausgewählten Darmabschnitten und den abgesetzten Darmabschnitten verlaufenden Marginalgefäße doppelt ligiert und durchtrennt wurden, konnte der Darm so ohne größeren Blutverlust proximal und distal abgetrennt werden. Um kleinere Blutungen an den Enden aus der angeschnittenen Submukosa zu stoppen, aber gleichzeitig die Enden zum Sekretabfluss offen zu halten, wurde in das Darmlumen jeweils ein 20 mm langer und 7 mm dicker Schlauch<sup>4</sup> eingeführt und der Darm gegen diesen Schlauch ligiert.

Das Lumen wurde jetzt zur idealen Ernährung und Protektion der Mukosa während der weiteren Prozedur mit 10 ml auf 37°C erwärmter, isotoner Glutamin-Alanin-Glukose-

---

<sup>1</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>2</sup> Kompressen i-GAUZE SWABS 10X10, Noba Verbandsmittel GmbH, Wetter-Wengern, D

<sup>3</sup> 7-0 Perma-Hand Seide, Ethicon GmbH, Norderstedt, D

<sup>4</sup> 2 cm einer Heidelberger Verlängerung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Lösung<sup>1</sup> mit einem Abbocath<sup>2</sup> als Spritzenaufsatz gespült und in eine feuchte Kompresse eingeschlagen.

Nach umschlagen des Darmkonvoluts nach links, erfolgte die Präparation der A. mesenterica superior von rechts, sowie das Absetzen der V. portae vom Pankreas, so dass diese bis zum Leberhilus freilag.

Über eine Lumbalvene wurden mit einer feinen Kanüle<sup>3</sup> 200 IE Heparin<sup>4</sup>, in 0,5ml NaCl<sup>5</sup> gelöst, injiziert, um die Bildung von Thromben im Explantat, während der Zeit in der der Darm nicht durchblutet wird, zu verhindern.

Die Aorta abdominalis wurde jetzt kurz oberhalb der Bifurkation im Retroperitonealraum freigelegt, abgeklemmt<sup>6</sup> und die gestaute Arterie mit einem Venenverweilkatheter<sup>7</sup> punktiert. Die Aorta wurde zwischen Truncus coeliacus und der A. mesenterica superior abgeklemmt, die Pfortader hilusnah durchtrennt und der Darm anschließend über den Katheter mit 5ml heparinisierten<sup>4</sup>, 4°C kalter NaCl-Lösung<sup>5</sup> gespült.

Die Aorta wurde jeweils 1mm kranial und kaudal des Abgangs der A. mesenterica superior durchtrennt und das Darmsegment entnommen. Das Tier verstarb daraufhin in Narkose. Die Aufbewahrung des Darms erfolgte in eisgekühlter, isotoner NaCl-Lösung<sup>8</sup>.

Als Adapter zum Perfusionssystem wurde in die Arterie ein Venenverweilkatheter<sup>9</sup> der Größe 20G, bei dem die Stahlkanüle entfernt wurde, hineingeschoben und mit einem Faden<sup>10</sup> befestigt.

---

<sup>1</sup> Siehe Kapitel 2.1.4 Medikamentöse Zusätze

<sup>2</sup> Abbocath-T, 13G, Abbott, Ireland

<sup>3</sup> Sterican® 27G 0.4X20, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>4</sup> Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm, D

<sup>5</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>6</sup> Codman Aneurysm Clips, Johnson & Johnson Medical Ltd, Berkshire, UK

<sup>7</sup> Vialon-Angiocath, 20G Insyte-W, Beckton Dickinson, Heidelberg, D

<sup>8</sup> Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

<sup>9</sup> Vialon-Angiocath, 20G Insyte-W, Beckton Dickinson, Heidelberg, D

<sup>10</sup> 7-0 Perma-Hand Seide, Ethicon GmbH, Norderstedt, D

### 2.2.1.3 Vorbereitungen am Perfusionssystem

Das Wasserbecken des Systems wurde vor jedem Versuch mit entionisiertem Wasser neu gefüllt.

Das Schlauchsystem wurde aus den gereinigten und getrockneten Schlauchteilen zusammengesteckt. Die Schläuche wurden wiederverwendet. Deshalb wurden sie nach den Versuchen erst mit Leitungswasser und dann mit entionisiertem Wasser unter Hochdruck gereinigt. Anschließend wurden die Schläuche mit Druckluft getrocknet. Danach wurde das System mit isotoner NaCl-Lösung gefüllt und bei maximaler Pumpenflussrate und unter leichtem beklopfen der einzelnen Teile, blasenfrei gemacht. Die zwei Bohrungen im Messblock, für die pH- und Sauerstoffsonde wurden ganz mit NaCl-Lösung gefüllt. Die beiden soeben geeichten Sonden konnten dann in den Sondenblock eingeführt werden, ohne dass Luft mitgenommen wurde. Zuletzt wurde die Druckmesssonde blasenfrei gemacht und danach geeicht. Die Pumpe wurde mit 2 ml/min laufen gelassen, damit keine neuen Luftblasen im System entstanden. Die Perfusoren wurden vorbereitet, die Perfusorschläuche entlüftet und am Boden des Blutreservoirs, in den Ausfluss platziert. Ein kurzer Verbindungsschlauch für den Anschluss an das Organ wurde mit NaCl gefüllt und mit einer speziellen Klemme abgeklemmt. Ein Behältnis mit Eiswasser, Kompresse und Frischhaltefolie für die Organpräparation wurde vorbereitet.

Kurz vor Beginn der Perfusion, wurde die NaCl-Lösung aus dem System abgelassen, bis das Reservoir fast leer war. Dann wurde das Reservoir mit dem Perfusionsblut gefüllt und die restliche NaCl-Lösung aus dem System abgelassen, bis unverdünntes Blut am Ende des Perfusionssystems erschien. Der pH-Wert des Perfusats wurde durch die Zugabe von Kohlendioxidgas über den Oxygenator auf 7,4 pH eingestellt. Ebenso wurde das Blut mit Sauerstoff auf 200 mmHg aufgesättigt.

## 2.2.2 Versuchsdurchführung und Auswertung

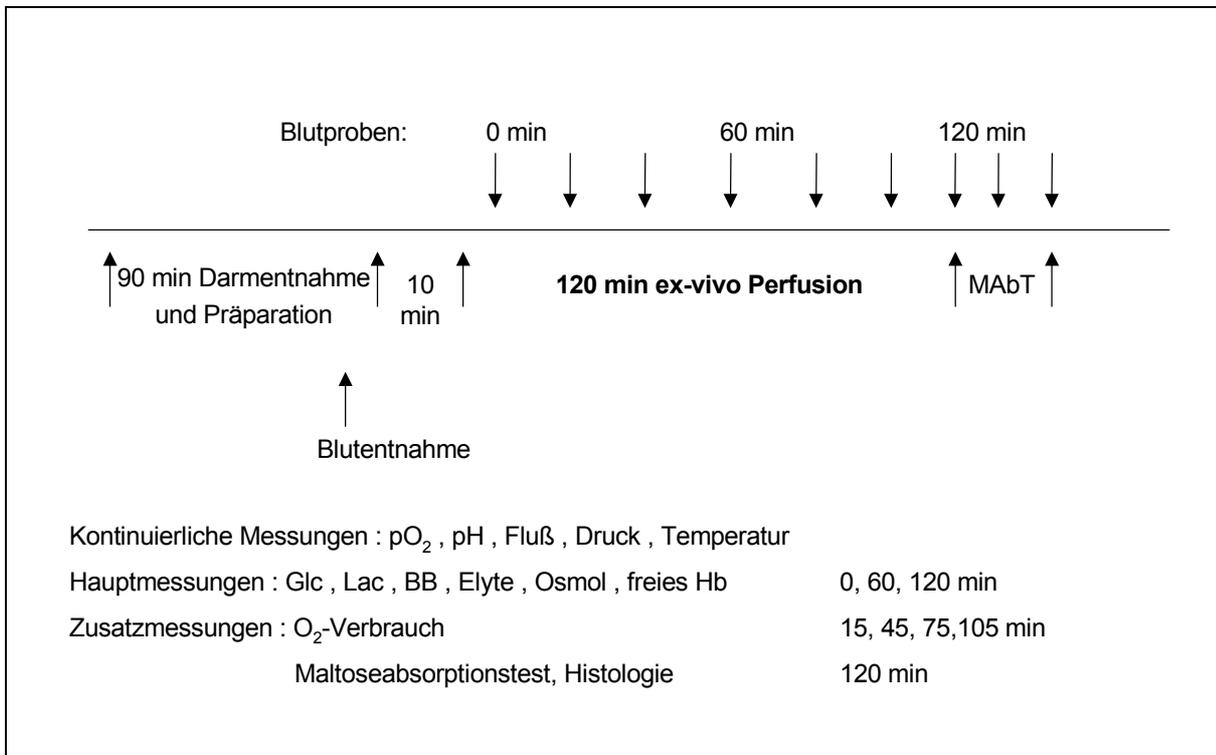


Abbildung 10: Versuchsaufbau der ex-vivo Dünndarmperfusion in einer Schemazeichnung

### 2.2.2.1 Perfusionssteuerung

Die Perfusion selbst wurde während des gesamten Versuchs vom Steuerungscomputer mit der entsprechenden Software und Karte automatisch geregelt. Die aktuellen Daten der Flussrate, des Perfusionsdrucks, des pH-Wertes, des Sauerstoffpartialdrucks und der Temperatur wurden am Kontrollmonitor angezeigt und alle 5 Sekunden aktualisiert. Dadurch war es möglich Abweichungen von den Sollwerten schnell zu erkennen und korrigierend einzugreifen.

### 2.2.2.2 Online Registrierungen

Alle Online Registrierungen wurden in kürzeren Intervallen auf dem Kontrollmonitor angezeigt, sowie in größeren Abständen und in Form von Mittelwerten auf der Festplatte abgespeichert.

#### 2.2.2.2.1 Sauerstoff

Den arteriellen Sauerstoffpartialdruck hielten wir während der Perfusion, durch Begasung des Oxygenators mit Sauerstoffgas, konstant zwischen 150 und 200 mmHg. Der Sauerstoffgehalt des Perfusats wurde ständig gemessen und alle 5 Sekunden am Kontrollmonitor aktualisiert. Alle 30 Sekunden wurde der Mittelwert der letzten 6 dieser Werte auf der Festplatte gespeichert. Die Justierung des Sauerstoffpartialdrucks wurde manuell durch Erhöhung oder Verminderung des angebotenen Gasvolumens erreicht. Versuche bei denen der Sauerstoffpartialdruck während der ex-vivo Perfusion über länger als zehn Minuten unter 80 mmHg absank wurden nicht gewertet.

#### 2.2.2.2.2 pH

Der pH-Wert des arterialisierten Perfusionsblut wurde kontinuierlich von der pH-Sonde gemessen. Alle 5 Sekunden wurden die ermittelten Werte am Monitor aktualisiert. Zusätzlich wurden alle 30 Sekunden die Mittelwerte auf der Festplatte gespeichert. Ziel war es den pH-Wert während der Perfusion zwischen 7,35 und 7,45 zu halten. Dies wurde durch die kontinuierliche Zufuhr von Kohlendioxidgas in einem Gemisch mit Sauerstoff von ca. 5:95, sowie durch die Zufuhr von Bikarbonat über Perfusor erreicht. Die für Feineinstellung des pH-Wertes wurde je nach gemessenem Wert die Menge des Kohlendioxidgases manuell erhöht oder vermindert.

#### 2.2.2.2.3 Blutdruck

Der Sollwert des Blutdrucks wurde immer auf 100 mmHg festgelegt. Die Aufrechterhaltung des Perfusionsdrucks wurde von der Computersteuerung automatisch durch die Regelung der Pumpengeschwindigkeit gewährleistet. Der Druck wurde

kontinuierlich gemessen. Jede Sekunde wurde ein aktueller Wert für die Berechnung eines Mittelwertes herangezogen. Die Berechnung eines Mittelwertes erfolgte alle 5 Sekunden. Das war notwendig, da es durch die okkludierend betriebene Rollerpumpe zu einem leicht pulsatilen Fluss von  $\pm 7$  mmHg kam und so eine punktuelle Registrierung des Perfusionsdrucks nicht genau genug gewesen wäre.

#### 2.2.2.2.4 Flussrate

Die Umdrehungsgeschwindigkeit und damit die Flussrate der Rollerpumpe wurde durch den Steuerungscomputer nach dem aktuellen Perfusionsdruck geregelt. Diese Steuerung geschah vollautomatisch nach dem Starten des Programms, ein manuelles Eingreifen war nicht erforderlich. Um eine Schädigung des Darms durch ein zu schnelles Ansteigen des Perfusionsdrucks zu verhindern, wurde die Steuerung der Pumpe so programmiert, dass es nach dem Start zu einem sanften Ansteigen der Flussrate und damit des Perfusionsdrucks kam. Die Angleichung an den Sollwert erfolgte asymptotisch. Dadurch wurden Exzesswerte in der Anlaufphase verhindert. Der Sollwert wurde nach ca. einer Minute erreicht.

In der Versuchsgruppe 3 wurde durch die kontinuierliche Zugabe von Noradrenalin über Perfusor die Flussrate manuell korrigiert. Kriterium für den Zusatz von Noradrenalin war ein Flussanstieg auf mehr als 4 ml/min. Ziel war es, das Minutenvolumen unter 6 ml/min zu halten.

#### 2.2.2.2.5 Temperatur

Die Temperaturregulation des Wasserbeckens wurde durch den Thermostat automatisch und zuverlässig gewährleistet. Zusätzlich wurde die Temperatur auf dem Kontrollmonitor angezeigt und durch die Abspeicherung alle 30 Sekunden auf die Festplatte dokumentiert.

### 2.2.2.3 Untersuchungen im Perfusat

Für die weiteren Untersuchungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen. Abgesehen von den venösen Proben zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden alle Proben aus dem arteriellen Schenkel über den Drei-Wege-Hahn abgenommen. Der Zeitraum zwischen Abnahme und Bestimmung der verschiedenen Parameter lag in der Regel zwischen 5 und 10 Minuten. Der Anteil der Hämolyse wurde aus eingefrorenem Serum zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt. Glukose, Laktat, Natrium und Kalium wurde in einem Arbeitsschritt am selben Gerät<sup>1</sup> bestimmt.

#### 2.2.2.3.1 Glukoseverbrauch

Zur Bestimmung des Glukosegehalts des Perfusats wurde aus dem arteriellen Schenkel über den Drei-Wege-Hahn Proben des Perfusats entnommen. Das geschah zu den Zeitpunkten null und 120 Minuten. Die Bestimmung des Glukosewertes am Analysegerät erfolgte innerhalb weniger Minuten, so dass auf eine Hemmung der Glykolyse im Aufbewahrungsgefäß verzichtet werden konnte. Da die Ausgangswerte immer etwas unterschiedlich waren, berechneten wir den Glukoseverbrauch aus der Differenz aus dem Anfangswert und dem Endwertwert, bezogen auf eine Minute und des jeweilige Organgewicht. Der Anteil der Blutzellen am Glukoseverbrauch wurde berücksichtigt. Der Glukoseverbrauch wurde in mg/min·100g angegeben.

#### Gleichung 2: Glukoseverbrauch

$$\Delta Glc = \frac{\{([Glc 0] - [Glc 1]) - k\} \cdot V}{120 \text{ min}} \cdot \frac{100}{w}$$

$\Delta Glc$	Glukoseverbrauch [mg/min·100g]
$Glc 0$	Ausgangswert Glukose im Perfusat [mg/dl]
$Glc 1$	Endwert Glukose im Perfusat [mg/dl]
$k$	Glukoseverbrauch durch Blutzellen: 191 µg/dl·min
$w$	Darmgewicht [g]
$V$	Volumen des Perfusatblutes [dl]

<sup>1</sup> Radiometer ABL 555, Radiometer Medical A/S, Brønshøj, DK

### 2.2.2.3.2 Laktat

Die Laktatbestimmung erfolgte dreimal, zu Beginn der Perfusion, nach 60 und nach 120 Minuten. Die Bestimmung des Laktatwertes erfolgte kurz nach der Abnahme, so dass auf eine Kühlung der Probe verzichtet wurde. Da die Ausgangswerte zu unterschiedlich waren, als dass man die späteren Werte direkt miteinander hätte vergleichen können, berechneten wir den Laktatanstieg während der Perfusion. Hierzu wurde von dem 120 Minutenwert der Ausgangswert abgezogen. Der Bezug auf das Organgewicht erfolgte ebenso wie bei der Berechnung des Glukoseverbrauchs:

#### Gleichung 3: Laktatproduktion

$$\Delta Lac = \frac{\{([Lac 0] - [Lac 1]) - b\} \cdot V \cdot 100}{120 \text{ min} \cdot w}$$

$\Delta Lac$	Laktatproduktion [mmol/min·100g]
$Lac 0$	Ausgangswert Laktat im Perfusat [mM]
$Lac 1$	Endwert Laktat im Perfusat [mM]
$b$	Laktatproduktion durch Blutzellen: 25µmol/l·min
$w$	Darmgewicht [g]
$V$	Volumen des Perfusatblutes [l]

### 2.2.2.3.3 Natrium und Kalium

Die Natrium- und Kaliumkonzentration der Perfusionslösung wurde am Beginn des Versuchs, nach 60 Minuten und nach 120 Minuten ermittelt. Die verwendete Probe wurde kurz nach der Abnahme aus dem Perfusionssystem an einem Analysegerät<sup>1</sup> mit elektrochemischer Sonde untersucht.

---

<sup>1</sup> Radiometer ABL 555, Radiometer Medical A/S, Brønshøj, DK

#### 2.2.2.3.4 Leukozyten

Die Leukozytenkonzentration im Perfusat wurde am Beginn und am Ende des Experiments bestimmt. Kurz nach der Abnahme der jeweiligen Probe wurde die Analyse an einem elektronischen Zählgerät<sup>1</sup> nach dem Prinzip der Impedanzmessung durchgeführt.

#### 2.2.2.3.5 Hämatokrit

Der Hämatokritwert des Perfusatbluts wurde dreimal zu den Zeitpunkten Null, 60 Minuten und 120 Minuten kontrolliert. Das Blut wurde nach der Entnahme in ein heparinisiertes Glasröhrchen aufgezogen, an einer Seite mit Kitt verschlossen und 3 min. bei 10.000 U/min in einer Zentrifuge zentrifugiert. Das Zellvolumen konnte danach im Verhältnis zum Gesamtvolumen in Prozent angegeben werden.

#### 2.2.2.3.6 Osmolarität

Zur Bestimmung der Osmolarität wurden zum Beginn und am Ende der Perfusion Blutproben entnommen. Die Osmolarität der Proben wurde an einem Osmometer, das nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung arbeitete, bestimmt.

#### 2.2.2.3.7 Sauerstoffverbrauch

Zur Errechnung des Sauerstoffverbrauchs wurden zu den jeweiligen Messzeitpunkten Blutproben entnommen. Dies geschah zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 45 Minuten, 75 Minuten und 105 Minuten. Die arterielle Probe wurde mit einer 2 ml Spritze am 3-Wege-Hahn abgenommen. Gleichzeitig wurde mit einem heparinisierten 100µl Glasröhrchen die venöse Probe direkt am Ausfluss aus der Pfortader abgenommen. Durch Abschirmung vom Luftsauerstoff wurde eine Wiederaufsättigung des Hämoglobins bis zur Bestimmung der Blutgase<sup>2</sup> verhindert. Der Blutfluss zum

---

<sup>1</sup> Coulter A<sup>c</sup>-T10, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA

<sup>2</sup> Radiometer ABL 555, Radiometer Medical A/S, Brønshøj, DK

Messzeitpunkt wurde später, anhand der Computeraufzeichnung recherchiert. Das Organ wurde am Ende des Versuchs, nachdem Mesenterium und Darminhalt entfernt worden waren, gewogen.

Der Sauerstoffverbrauch aus hämoglobingebundenem Sauerstoff, errechnete sich aus der nachfolgenden Formel.

**Gleichung 4: Sauerstoffverbrauch aus hämoglobingebundenem Sauerstoff**

$$\Theta_{Hb} = \dot{V} \cdot Hb \cdot \eta \cdot \left( \frac{Sat_a - Sat_v}{100} \right) \cdot \frac{100}{w}$$

$\Theta_{Hb}$	Verbrauch des hämoglobingebundenen Sauerstoffs [ml/min·100g]
$\dot{V}$	Fluss [ml/min]
$Hb$	Hämoglobin [g/ml]
$\eta$	Hüfner-Zahl: 1,34 [ml O <sub>2</sub> /g Hb]
$Sat_a$	Arterielle Sauerstoffsättigung [%]
$Sat_v$	Venöse Sauerstoffsättigung [%]
$w$	Organgewicht [g]

Da der arterielle Sauerstoffpartialdruck im Mittel um 200 mmHg gehalten wurde, lag der Anteil des verbrauchten Sauerstoffs, der aus physikalisch gelöstem Sauerstoff im Plasma gewonnen wurde, bei durchschnittlich 24 % des gesamten Sauerstoffverbrauchs und musste daher berücksichtigt werden.

**Gleichung 5: Sauerstoffverbrauch aus physikalisch gelöstem Sauerstoff**

$$\Theta_{Ph} = \dot{V} \cdot \alpha \cdot (p_a - p_v) \cdot \frac{100}{w}$$

$\Theta_{Ph}$	Verbrauch des physikalisch gelösten Sauerstoffs [ml/min·100g]
$\alpha$	Lösungskoeffizient[137] für Sauerstoff in Blutplasma bei 37°C: 2,813·10 <sup>-5</sup> [ml O <sub>2</sub> /l·mmHg]
$p_a$	Arterieller Sauerstoffpartialdruck [mmHg]
$p_v$	Venöser Sauerstoffpartialdruck [mmHg]

Der gesamte Sauerstoffverbrauch aus hämoglobingebundenem Sauerstoff und physikalisch gelöstem Sauerstoff, errechnete sich aus der nachfolgenden Formel.

#### Gleichung 6: Gesamter Sauerstoffverbrauch

$$\Theta G = \dot{V} \left\{ Hb \cdot \eta \cdot \left( \frac{Sat_a - Sat_v}{100} \right) + \alpha \cdot (p_a - p_v) \right\} \frac{100}{w}$$

$\Theta G$  Gesamter Sauerstoffverbrauch  $\Theta Hb + \Theta Ph$  [ml/min·100g]

#### 2.2.2.3.8 Freies Hämoglobin

Zur Bestimmung des freien Hämoglobins und damit der Hämolyse wurde am Ende des Versuchs ca. 2ml des Perfusatbluts entnommen. Das Blut wurde zentrifugiert und das Serum anschließend bei  $-80^{\circ}C$  eingefroren. Das freie Hämoglobin wurde zu einem späteren Zeitpunkt photometrisch nach Standardmethoden der Klinischen Chemie und unter Berücksichtigung der Absorptionsspektren von Rattenhämoglobin bestimmt.

#### 2.2.2.3.9 Maltoseabsorption

Um die Funktionalität und Vitalität des Dünndarms nach den 120 Minuten ex-vivo Perfusion zu beweisen, wurde jeweils am Ende eines Versuchs ein Maltoseabsorptionstest (MAbT) durchgeführt. Hierzu wurden 90 mg Maltose in 2 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgelöst und auf  $37^{\circ}C$  erwärmt. Das Darmlumen wurde zunächst mit 5 ml erwärmter Kochsalzlösung vom produzierten Mukus freigespült, anschließend wurde die Maltoselösung injiziert. Um die Mikrozirkulation in der Darmmukosa durch einen Überdruck im Lumen nicht zu behindern, wurden die Darmenden auch weiterhin offen gelassen.

Nach 15 und nach 30 Minuten wurde der absolute Glukoseanstieg in mg im Perfusatblut, im Vergleich zum Ausgangswert und bezogen auf das Organgewicht und das Perfusatvolumen bestimmt.

### Gleichung 7: Maltoseabsorptionstest

$$\Delta Glc = ([Glc 0] - [Glc 1]) \cdot V \cdot \frac{100}{w}$$

$\Delta Glc$	Glukoseaufnahme [mg/100g]
$Glc 0$	Ausgangswert Glukose [mg/dl]
$Glc 1$	Endwert Glukose nach 15 bzw. 30 Minuten [mg/dl]
$w$	Darmgewicht [g]
$V$	Volumen des Perfusatblutes [dl]

Maltose ist ein Glycosyl-Glycose-Disaccharid, das bei der enzymatischen Hydrolyse von Stärke entsteht. Es besteht aus zwei,  $\alpha$ 1-4 verknüpften Molekülen Glukose (s. Abbildung 11). Maltose wird im Duodenum und im Jejunum vom dort auf dem Mikrovilli vorhandenem Bürstensaumenzym Maltase in zwei Moleküle Glucose gespalten. Die freigewordene Glucose wird nicht mehr in das Darmlumen abgegeben, sondern sofort, über einen energieabhängigen Transportmechanismus in die Mukosazelle resorbiert. Das bedeutet, dass für die Aufnahme von Glukose sowohl die Bürstensaumenzyme intakt sein müssen, als auch eine ausreichende Energieversorgung für die Mukosazellen vorhanden sein muss.

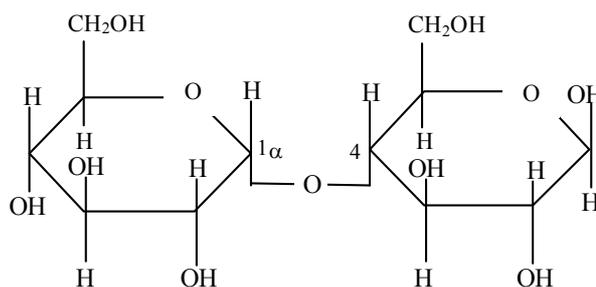


Abbildung 11: Strukturformel von Maltose (O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glucopyranose)

#### 2.2.2.4 Lichtmikroskopie

Zur Gewinnung der Histologie wurden direkt nach dem Versuch zwei repräsentative Proben aus dem Darm entnommen und in 4 %iger Formalinlösung zwischengelagert. In der Gruppe eins wurde nach 7 verschiedenen Versuchen Proben entnommen, in der Gruppe zwei und drei stammten die Proben aus jeweils 6 unterschiedlichen Versuchen. Insgesamt wurden somit 19 Versuche histologisch ausgewertet. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte im Institut für Pathologie der Ludwig Maximilians Universität München durch Herrn Dr. med. M. Weiss. Von den Proben wurden herkömmliche Paraffinschnitte hergestellt. Anschließend wurden die Präparate mit Hämatoxilin-Eosin und zur speziellen Darstellung des Bürstensaums und der Becherzellen mit PAS gefärbt.

#### 2.2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der erhobenen Daten wurden graphisch dargestellt und die Werte zusätzlich im Text, zusammen mit der Standardabweichung (SD), angegeben. Ein Teil der Daten wurde aus Platzgründen im tabellarischen Anhang aufgeführt. In den Säulen- und Punktdiagrammen stellten die Fehlerbalken die jeweilige Standardabweichung dar. Wenn Box-Plots zur Darstellung verwendet wurden, stellte die gestrichelte Zusatzlinie den Mittelwert, die durchgezogene Linie den Median dar. Die Kreise zeigten das 99 %ige Vertrauensintervall (99 % CI) an.

Zur Untersuchung, ob bei unterschiedlichen Mittelwerten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu einem Messzeitpunkt, oder innerhalb der selben Gruppe zu verschiedenen Messzeitpunkten bestanden, kamen je nach der Qualität der Daten verschiedene Tests zur Anwendung. Für den ersten groben Vergleich zwischen den drei Gruppen wurde zunächst der H-Test von Kruskal und Wallis herangezogen. Für normalverteilte Daten, wurde der T-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben verwendet. Die nicht normalverteilten Daten wurden

Whitney-Mann-Rangsummen-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben analysiert. Alle Graphiken wurden mit SigmaPlot<sup>®1</sup> entworfen, die Statistischen Berechnungen wurden mit SigmaStat<sup>®2</sup> durchgeführt.

---

<sup>1</sup> SigmaPlot 3.0, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA

<sup>2</sup> SigmaStat 2.0, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA

### 3 Ergebnisse

Es werden zunächst die Auswertungen der Computeraufzeichnungen erörtert. Danach werden die Ergebnisse der Untersuchungen von Proben aus dem Perfusat und die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen präsentiert.

#### 3.1 Online Computeraufzeichnungen

Die Online Computeraufzeichnungen umfassten die Flussrate, den Perfusionsdruck, die arterielle Sauerstoffsättigung, den pH-Wert und die Temperatur.

##### 3.1.1 Flussraten



**Abbildung 12: Dünndarmsegment während der ex-vivo Perfusion. Im Mesenterium sind die zusammen verlaufenden Arterien und Venen deutlich zu erkennen. Der Darm selbst ist gleichmäßig durchblutet und besitzt eine rosige Farbe. Links unten im Bild kann man Lymphgefäße sehen, links oben ist antimesenterial am Darm ein Payerscher Plaque zu sehen.**

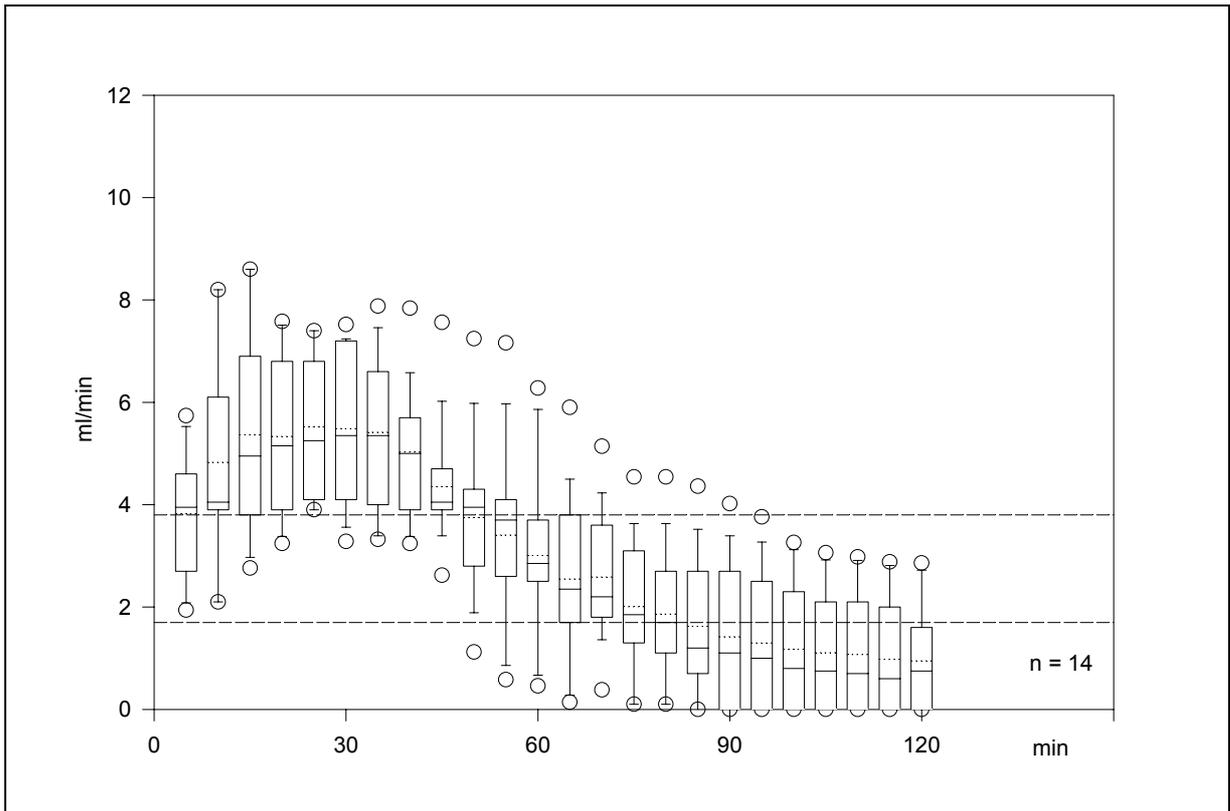
Die Flussraten der Versuche waren einer der empfindlichsten Parameter um die Qualität der einzelnen ex-vivo Perfusionen noch während des Versuchs einschätzen zu können. Auf eine Vielzahl von Störungen unterschiedlichster Ursache reagierte der Darm mit einer gestörten Gefäßtonisierung, entweder mit einer Vasokonstriktion oder mit einer Vasodilatation. Die Bewertung der Perfusion während des Versuchs anhand der Abweichung von der physiologischen Flussrate in vivo, zeigte im späteren Vergleich mit der dazugehörigen Histologie eine erstaunliche Übereinstimmung. Es war so möglich den Erfolg oder Misserfolg der Perfusion schon während des jeweiligen Versuchs abzuschätzen. Ein extremes Beispiel aus früheren Versuchsreihen für solche Störeinflüsse, waren makroskopisch kaum sichtbare Luftembolien, die sich durch einen plötzlichen Druckanstieg und gleichzeitigen Flussabfall bemerkbar machten und dann zum Abbruch des Experiments zwangen. Im weitaus geringeren Maße hatten auch einige der verwendeten Perfusionslösungen nachteiligen Einfluss auf die Qualität der Perfusion und das zeigte sich ebenfalls in ungünstig hohen oder niedrigen Flussraten. Als Anhalt für die physiologischen Flussraten im Rattendünndarm in vivo dienten sowohl Angaben aus der Literatur[78,163,55,34,165], als auch eigene Messungen. Diese wurden mit einem Doppler-flow-Meter<sup>1</sup>, das speziell für solche Messungen im Kleintierversuch entwickelt wurde, durchgeführt. Die physiologische Durchblutung des Rattendünndarms beträgt demnach zwischen 1,7 und 3,8 ml/min (95% KI). Die Ergebnisse der drei verschiedenen Perfusionslösungen werden nun im einzelnen dargestellt:

- **Der Fluss nach Hämodilution mit NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer (Gruppe 1)**

Bei der Verwendung des NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffers zur Hämodilution kam es prompt zu einem optimalen Flussanstieg auf physiologisch hohe Werte. Nach einem Maximum nach ungefähr 30 Minuten fiel der Fluss dann rapide auf nicht mehr vitale, zu niedrige Werte ab. Makroskopisch sah der Darm hyperämisch und bläulich-livide verfärbt aus.

---

<sup>1</sup> Doppler-flow-Meter GD502, Tera-Technologies, San Francisco, CA, USA

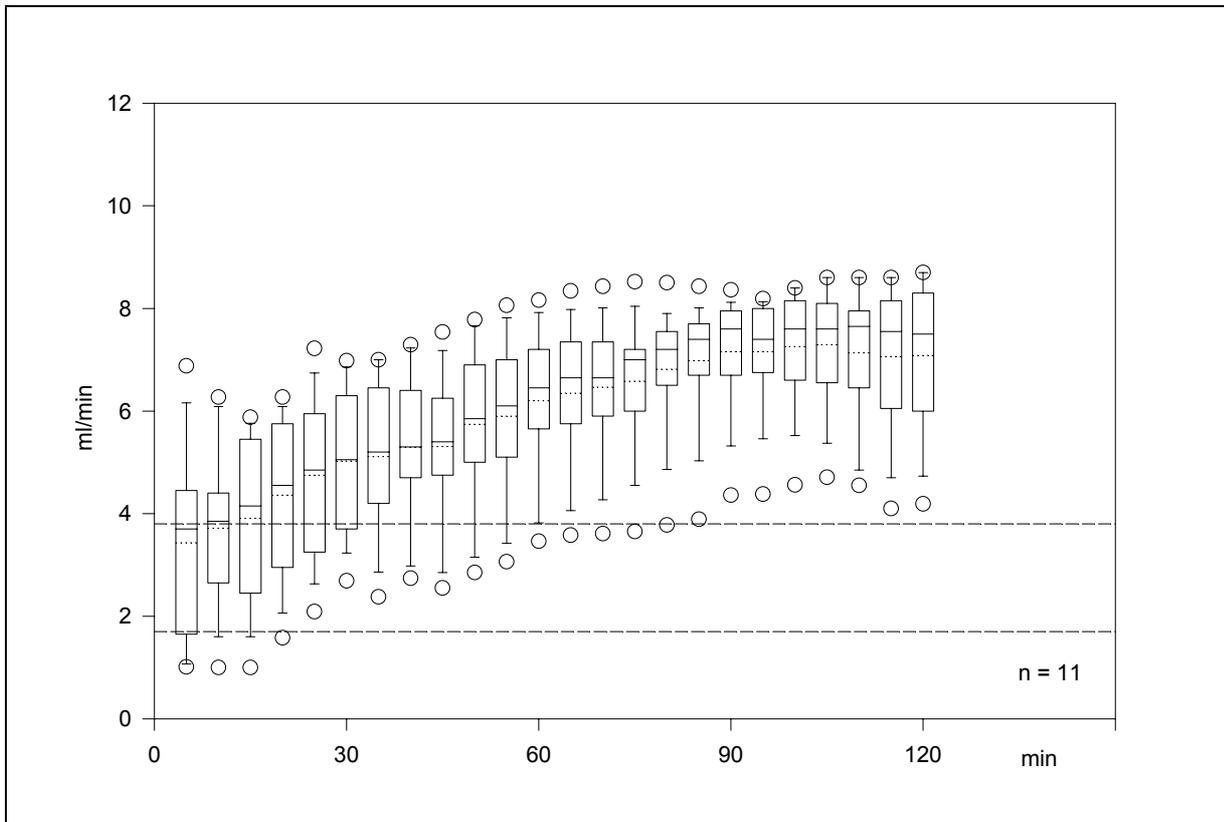


**Abbildung 13: Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1): Guter Flussanstieg zu Beginn, dann nach 30 Minuten kontinuierlicher Abfall. Gestrichelte Linien: Ergebnisse von in vivo Messungen des Minutenvolumens als Referenzbereich (95%KI)**

Es kam zu einer massiven Schleimproduktion und einer erheblich gesteigerten Peristaltik, die alle als Zeichen einer mangelhaften Sauerstoffversorgung des Organs zu werten sind.

Die Werte für 30 Minuten waren im Mittel 5,5 ml/min ( $\sigma \pm 1,57$ ). Nach 60 Minuten lag der Fluss bei 3,0 ml/min ( $\sigma \pm 1,76$ ), nach 90 Minuten bei 1,42 ( $\sigma \pm 1,43$ ) und nach 120 Minuten bei 1,0 ml/min ( $\sigma \pm 1,05$ ). Der Maximalwert der Flussrate in der Gruppe 1 wurde im Mittel nach 25 Minuten mit 5,52 ml/min ( $\sigma \pm 1,39$ ) erreicht. Nach 60 Minuten lagen die Werte bei drei Versuchen bereits unter 1 ml/min, nach 90 Minuten war dies bei insgesamt sechs Versuchen der Fall. Bei fünf Versuchen war überhaupt kein Fluss mehr messbar. Am Ende war bei acht Versuchen, also bei 57 % aller Versuche in dieser Gruppe, der Fluss auf unter 1 ml/min gefallen. Bei sechs Versuchen war nach 120 Minuten kein Fluss mehr messbar. Das entspricht 43 % aller Versuche in dieser Gruppe.

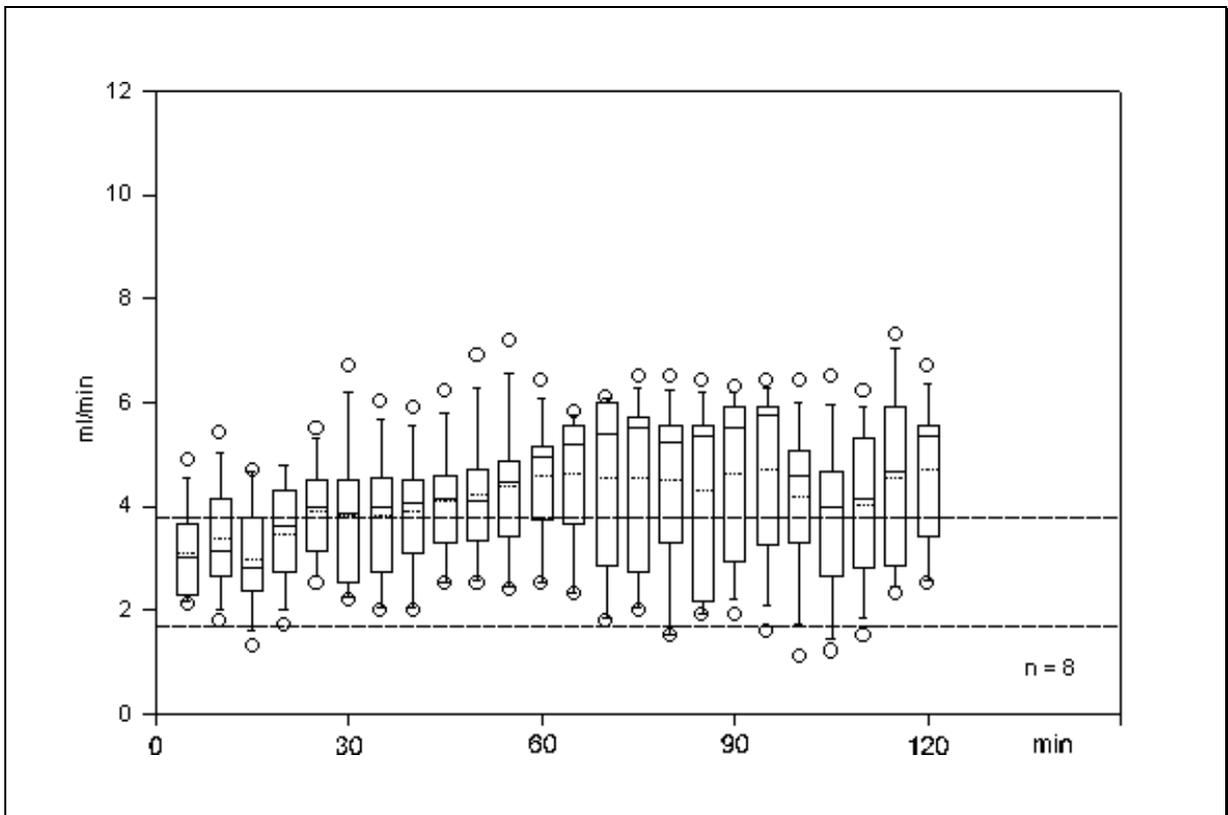
- **Der Fluss nach Hämodilution mit Krebs-Puffer (Gruppe 2)**



**Abbildung 14: Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2).** Es kam hier zu einem schnellen Anstieg auf unphysiologisch hohe Flussraten. Gestrichelte Linien: Ergebnisse von *in vivo* Messungen des Minutenvolumens als Referenzbereich (95%KI). Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median

Bei der Verwendung von Krebs-Puffer als Hämodilutionslösung kam es zu einem schnellen Flussanstieg auf unphysiologisch hohe Werte. Bei Ausdehnung der Perfusionsdauer zeigte sich ein weiterer Anstieg des Minutenvolumens auf zum Teil mehr als 10 ml/min (Daten nicht gezeigt). Makroskopisch sah der Darm hyperämisch und entzündlich aus. Die Schleimproduktion in das Darmlumen war relativ hoch. Hyperperistaltik trat in weitaus geringerem Maße als in der Gruppe 1 auf. Die Mittelwerte der Flussraten lagen nach 30 Minuten bei 5,0 ml/min ( $\sigma \pm 1,45$ ), nach 60 Minuten bei 6,2 ml/min ( $\sigma \pm 1,45$ ), nach 90 Minuten bei 7,1 ml/min ( $\sigma \pm 1,18$ ) und nach 120 Minuten bei 7,1 ml/min ( $\sigma \pm 1,6$ ). Der Maximalwert wurde im Mittel nach 105 Minuten mit 7,3 ml/min ( $\sigma \pm 1,22$ ) erreicht.

- **Der Fluss nach Hämodilution mit Krebs-Puffer und unter kontinuierlicher Substitution von Noradrenalin (Gruppe 3)**



**Abbildung 15: Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3). Ein unkontrollierter Flussanstieg wurde durch die fein dosierte Zugabe von Noradrenalin erfolgreich verhindert. Gestrichelte Linien: Ergebnisse von in vivo Messungen des Minutenvolumens als Referenzbereich (95%KI). Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

In dieser Gruppe wurde das Perfusionsblut mit Krebspuffer verdünnt und während des Versuchs ab einem Flussanstieg auf mehr als 4 ml/min durch Zugabe von Noradrenalin konstant im hochnormalen Bereich gehalten. Ziel war es, den Fluss nicht über 6 ml/min ansteigen zu lassen. Die benötigte Menge an Noradrenalin lag hierbei zwischen 70 und 166 ng/min.

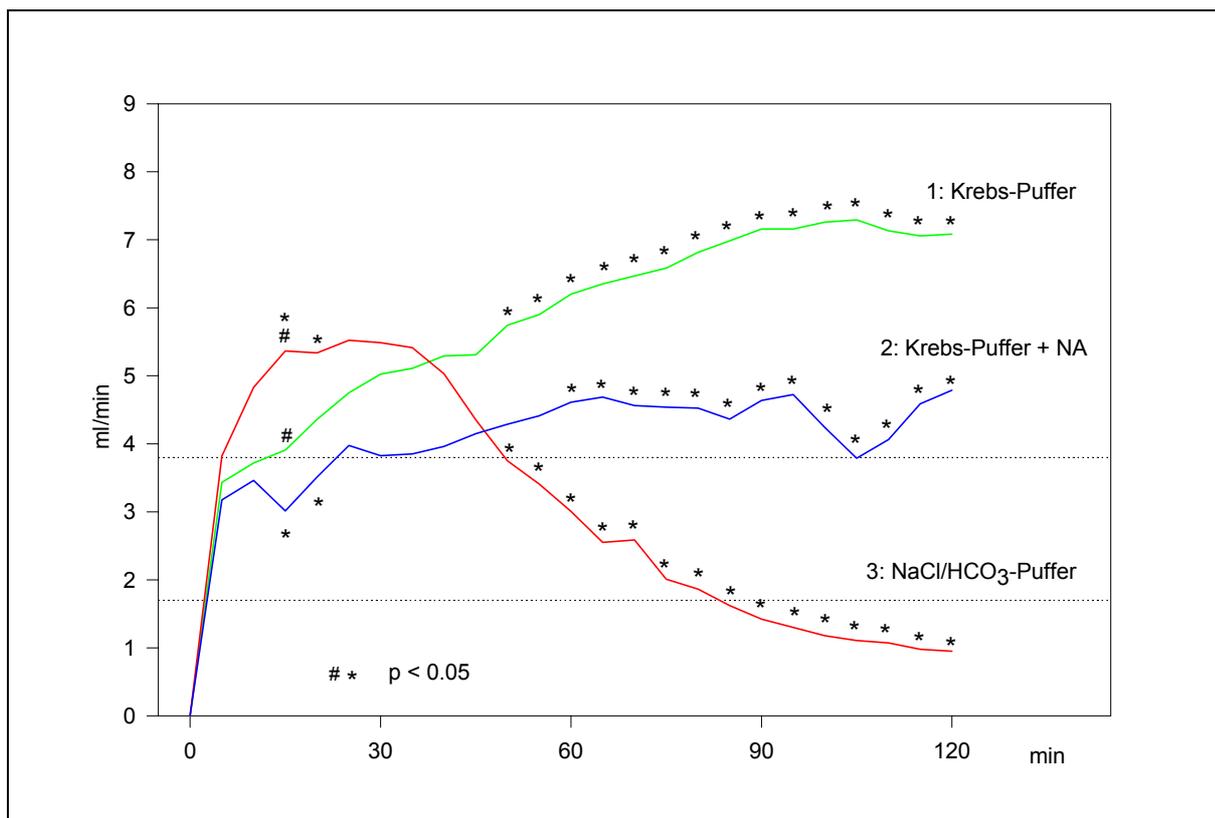
Wie aus der Abbildung 13 ersichtlich, war es hier möglich einen unkontrollierten Flussanstieg wie in Gruppe 2 zu verhindern und den Fluss unter 6 ml/min zu halten. Der etwas unruhige Verlauf der Kurve erklärt sich durch das prompte Ansprechen der Gefäße auf eine Erhöhung der Dosis des verabreichten Noradrenalins. Resultat war dann ein Anstieg des peripheren Widerstands und damit die automatische Drosselung des Flusses durch die Computersteuerung. Die kritische Untergrenze von etwa

1 ml/min wurde jedoch bei allen 8 Versuchen nicht unterschritten.

Makroskopisch sah der Darm rosig und vital aus. Hyperperistaltik und Hypersekretion traten nicht oder nur in sehr geringem Maße auf.

Die Mittelwerte der Flussraten lagen nach 30 Minuten bei 3,8 ml/min ( $\sigma \pm 1,51$ ), nach 60 Minuten bei 4,6 ml/min ( $\sigma \pm 1,33$ ), nach 90 Minuten bei 4,6 ml/min ( $\sigma \pm 1,76$ ) und nach 120 Minuten bei 4,8 ml/min ( $\sigma \pm 1,47$ ).

Bei der statistischen Auswertung der drei Versuchsgruppen im Vergleich konnten in den ersten zehn Minuten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Nach 15 Minuten waren die Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2, sowie zwischen den Gruppen 1 und 3 statistisch signifikant ( $p_{15} < 0,01$ ). Nach 20 Minuten war nur die Differenz zwischen der Gruppe 1 und 3 signifikant ( $p_{20} < 0,05$ ). Im weiteren Verlauf waren bis zur 50. Minute ex-vivo Perfusion keine signifikanten Unterschiede mehr



**Abbildung 16: Mittelwerte der Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Alle drei Gruppen im Vergleich). Signifikante Unterschiede nach 60 Minuten ex-vivo Perfusion. Gestrichelte Linien: Ergebnisse von in vivo Messungen des Minutenvolumens als Referenzbereich (95%KI).**

feststellbar. Nach 50 Minuten gab es wieder einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 ( $p_{50'} < 0,01$ ,  $p_{55'} < 0,01$ ) der Fall. Ab der 60. Minute bis zum Ende der Versuche waren die Differenzen aller Gruppen gegeneinander statistisch signifikant ( $p_{60'-120'} < 0,001$ ).

### 3.1.2 Perfusionsdruck

Das Ziel, den Perfusionsdruck auf einem kontinuierlichen arteriellen Mitteldrucks von 100 mmHg zu halten, wurde durch einen Rückkopplungsmechanismus zwischen Drucksensor und Rollerpumpe mittels Computersteuerung erreicht.

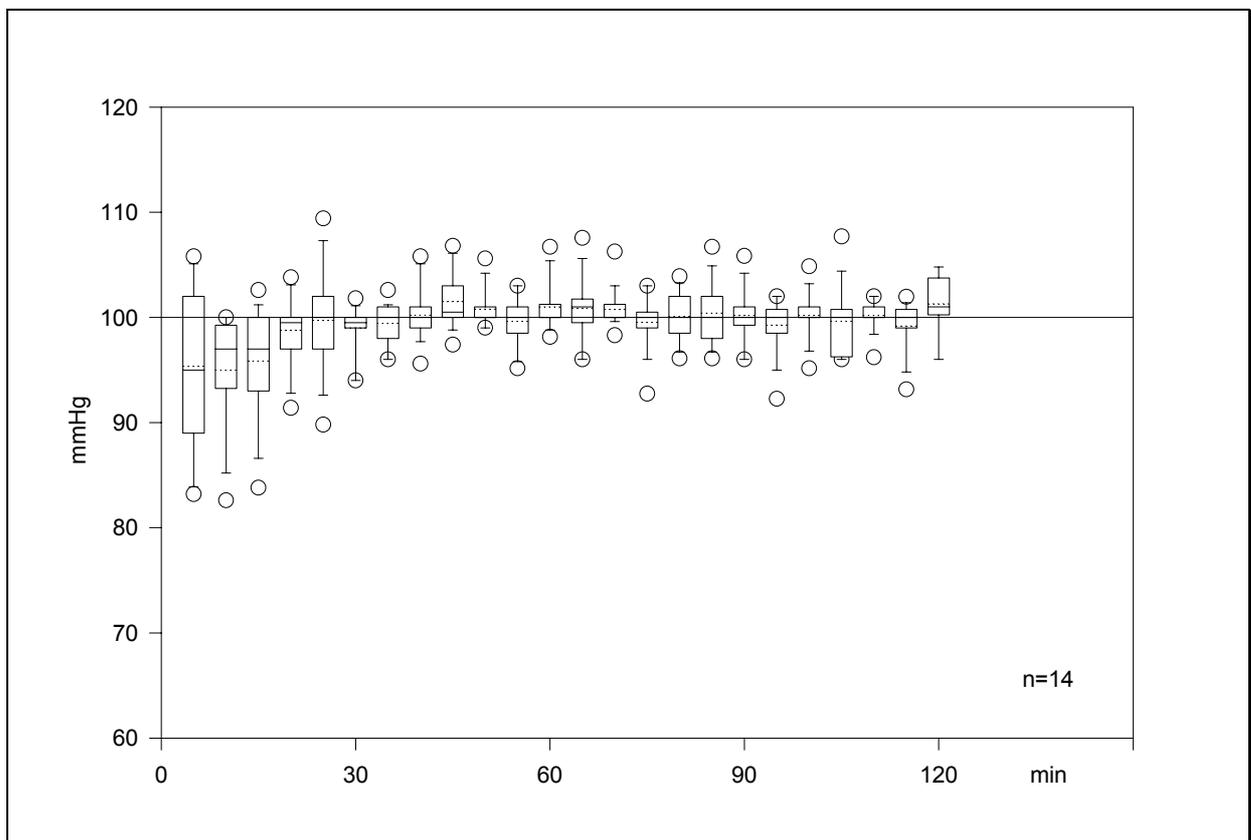
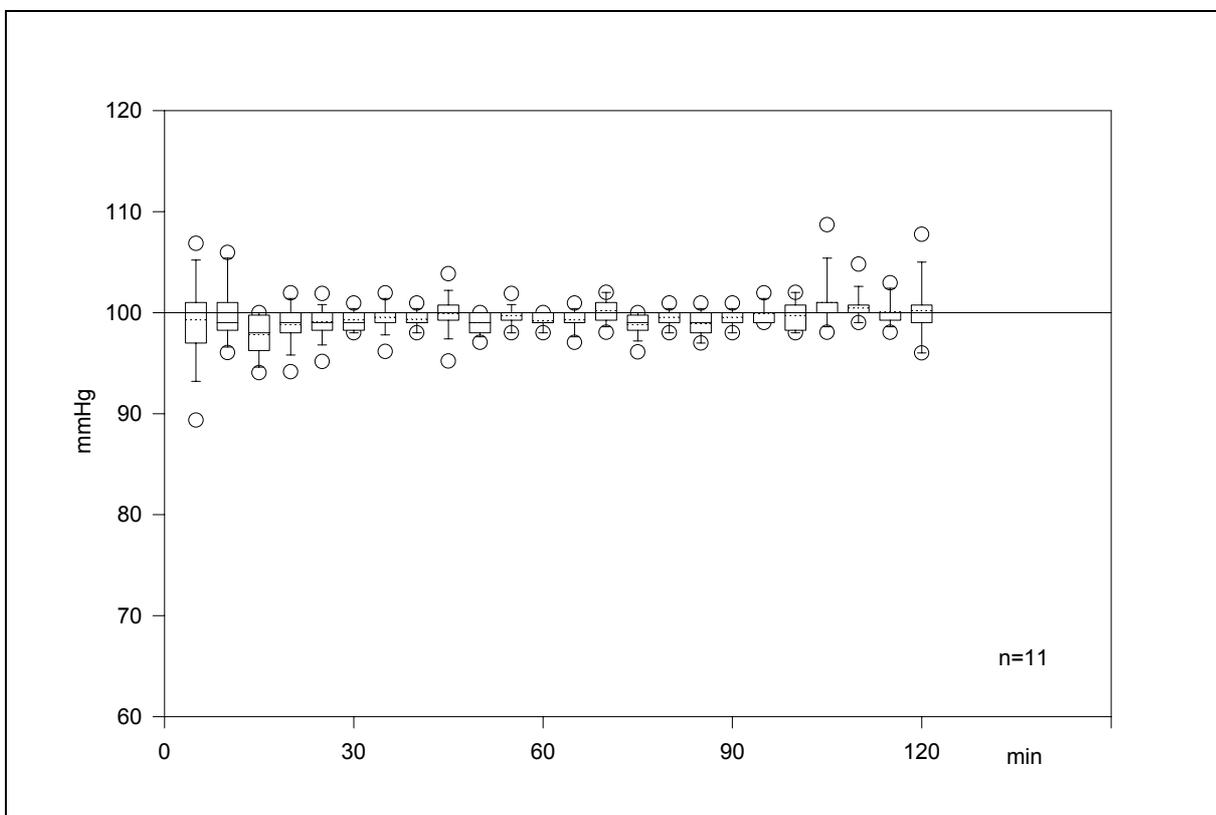


Abbildung 17: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1). Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median

In der Gruppe 1 lagen die Werte am Anfang knapp unterhalb des Sollwerts von 100 mmHg, da es hier durch einen abnehmenden Gefäßwiderstand noch zu einem stetigen Flussanstieg kam (s. Kap. 3.1.1). Der Perfusionsdruck lag in dieser Gruppe nach 30 Minuten und im weiteren Verlauf konstant bei Werten um 100 mmHg.

Die Mittelwerte betrugen nach 30 Minuten 99 mmHg ( $\sigma \pm 2,4$ ), nach 60 Minuten 101 mmHg ( $\sigma \pm 2,4$ ), nach 90 Minuten 100 mmHg ( $\sigma \pm 2,8$ ) und nach 120 Minuten 101 mmHg ( $\sigma \pm 3,3$ ). Die einzelnen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt.



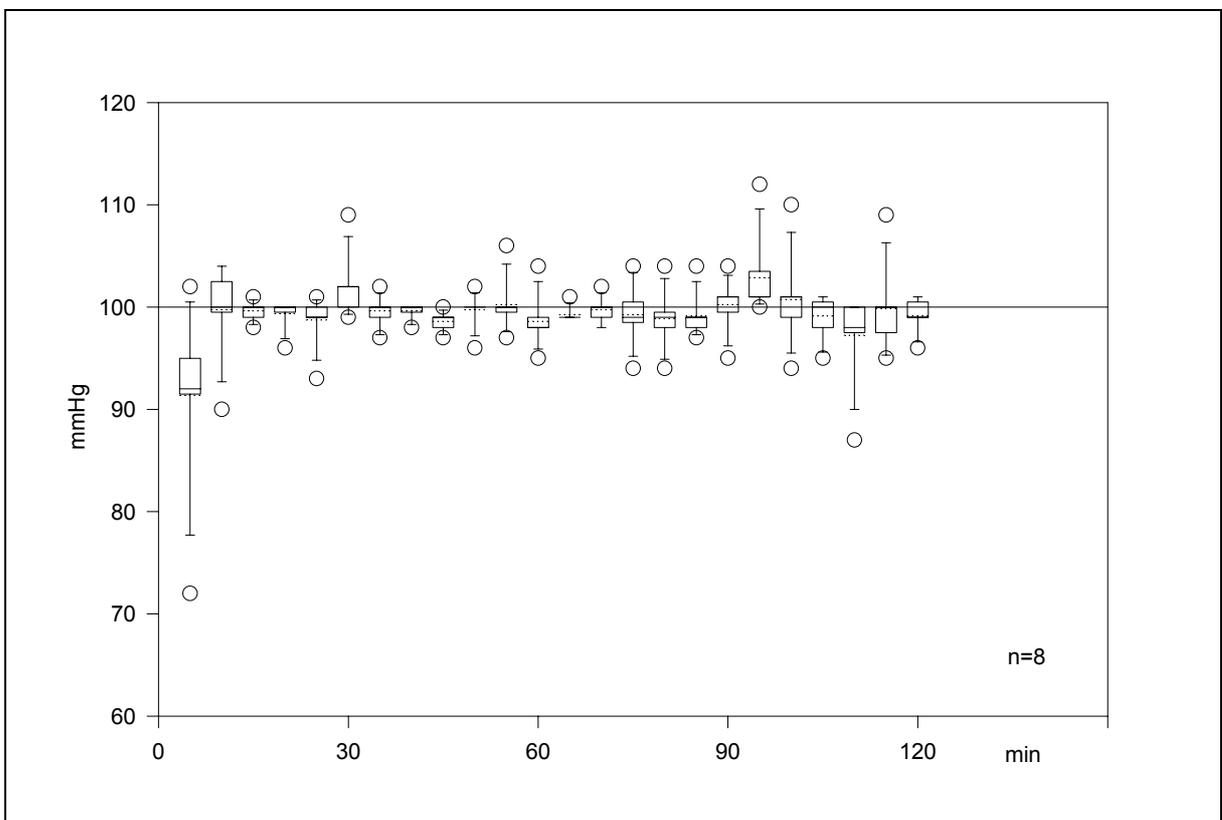
**Abbildung 18: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2). Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

In der Versuchsgruppe 2 wurde der Sollwert des Perfusionsdrucks bereits nach fünf Minuten erreicht. Abgesehen von einigen Schwankungen bewegten sich die Drücke auch im weiteren Verlauf konstant um 100 mmHg.

Die Werte lagen nach 30 Minuten bei 99 mmHg ( $\sigma \pm 1,0$ ), nach 60 Minuten bei 99 mmHg ( $\sigma \pm 0,8$ ), nach 90 Minuten bei 100 mmHg ( $\sigma \pm 0,9$ ) und nach 120 Minuten bei

100 mmHg ( $\sigma \pm 3,3$ ). Die einzelnen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt.

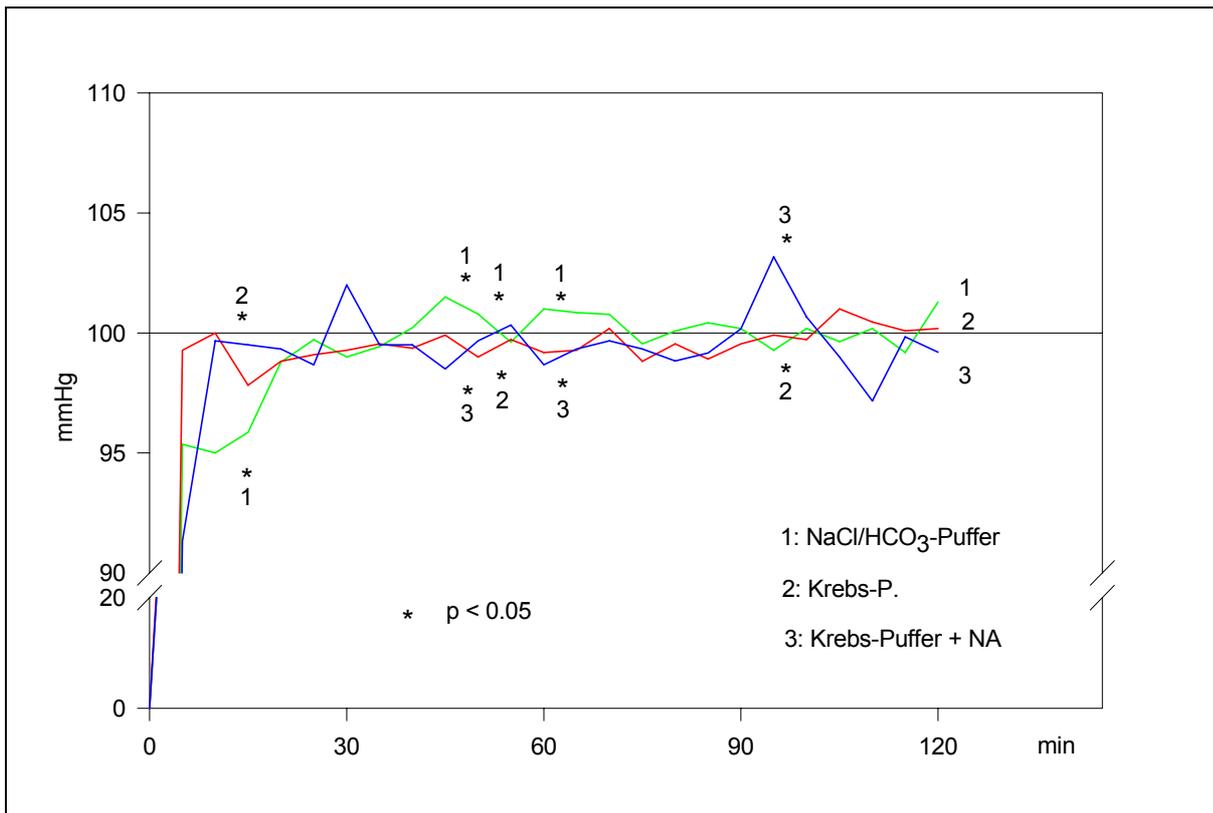
Bei der Verwendung von Krebspuffer als Hämodilutionslösung und unter Substitution von Noradrenalin ab einem Flussanstieg auf mehr als 4 ml/min kam es schnell zu einer Angleichung an den Sollwert des Perfusionsdrucks von 100 mmHg. Während des Versuchs lag die überwiegende Mehrzahl der gemessenen Werte um den Sollwert. Vereinzelt gab es stärkere Abweichungen vom Mittelwert, die durch eine vorübergehende leichte Überdosierung des Katecholamins verursacht wurden.



**Abbildung 19: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3). Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

Als Reaktion darauf lässt sich der extrem hohe Wert nach 110 Minuten erklären. Hier wurde der Katecholaminperfusor vorübergehend abgestellt. Insgesamt kann man sagen, dass auch in dieser Gruppe die ex-vivo Perfusion druckkonstant durchgeführt wurde.

Der Perfusionsdruck betrug im Mittel nach 30 Minuten 102 mmHg ( $\sigma \pm 3,6$ ), nach 60 Minuten 99 mmHg ( $\sigma \pm 2,9$ ), nach 90 Minuten 100 mmHg ( $\sigma \pm 3,0$ ) und am Ende der Versuche im Mittel 99 mmHg ( $\sigma \pm 2,0$ ). Die einzelnen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen und Standardfehlern sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 20: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Alle drei Gruppen im Vergleich)**

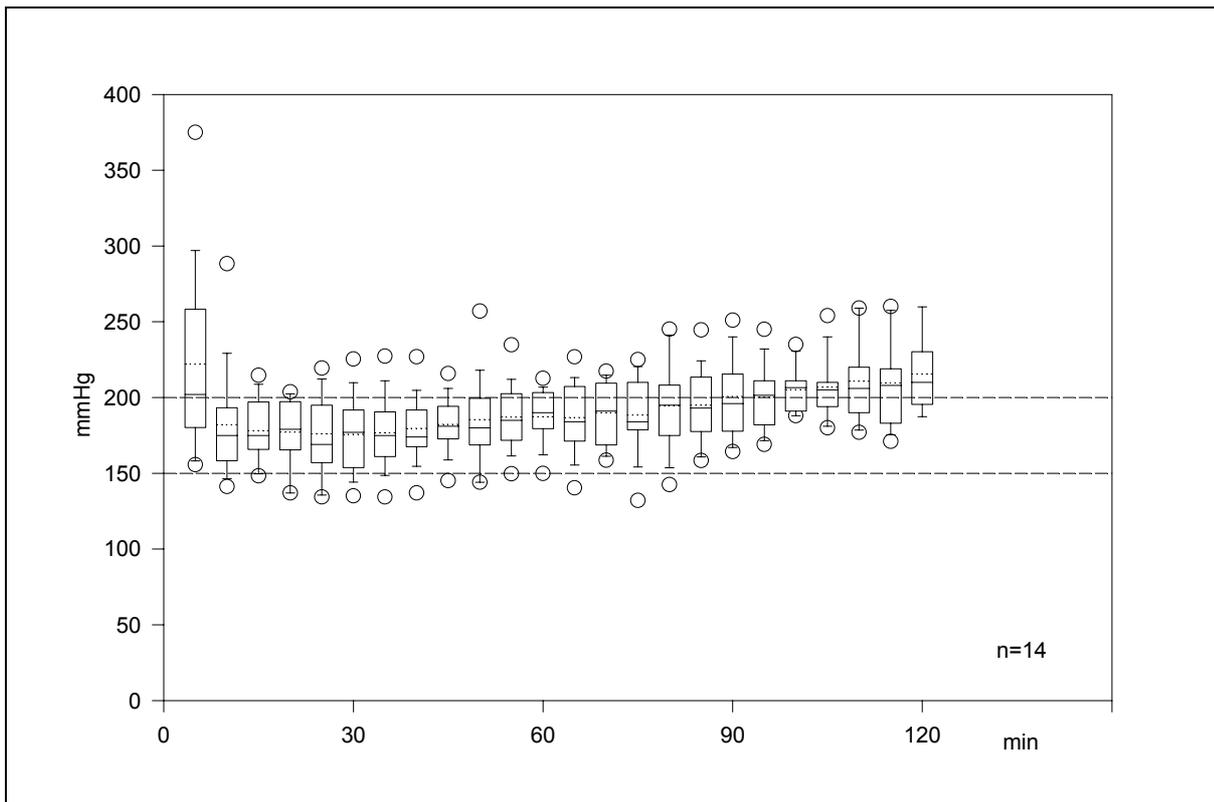
Die Unterschiede im arteriellen Mitteldruck zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen waren nur in den ersten zehn Minuten der Versuche deutlich. Das Maximum lag hier bei 7,9 mmHg Differenz zwischen den Mittelwerten der Gruppen 2 und 3. Die Streuung war jedoch zu groß, um den Unterschied als statistisch signifikant zu werten. Einen signifikanten Unterschied von 5,0 mmHg gab es zwischen den Gruppen 1 und 2 nach zehn Minuten ( $p_{10} < 0,05$ ). Im weiteren Verlauf waren bis auf eine alle Divergenzen zwischen den Mittelwerten kleiner als 3 mmHg und damit nicht als relevant zu werten. Die Unterschiede zwischen der Gruppe 1 und der Gruppen 2 bzw.

3 nach 45, 50 und nach 60 Minuten waren statistisch signifikant ( $p_{45}<0,01$ ,  $p_{50}<0,05$ ,  $p_{60}<0,01$ ). Nach 95 Minuten gab es einen signifikanten Unterschied von 3,3 mmHg zwischen der Gruppe 2 und 3 ( $p_{95}=0,04$ ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Unterschiede zwischen den mittleren Perfusionsdrücken der einzelnen Versuchsgruppen äußerst gering und darüber hinaus in der Mehrzahl nicht statistisch signifikant waren. Die ex-vivo Perfusionen wurde in allen Gruppen druckkonstant bei einem arteriellen Mittelwert von 100 mmHg durchgeführt.

### **3.1.3 Arterieller Sauerstoffpartialdruck**

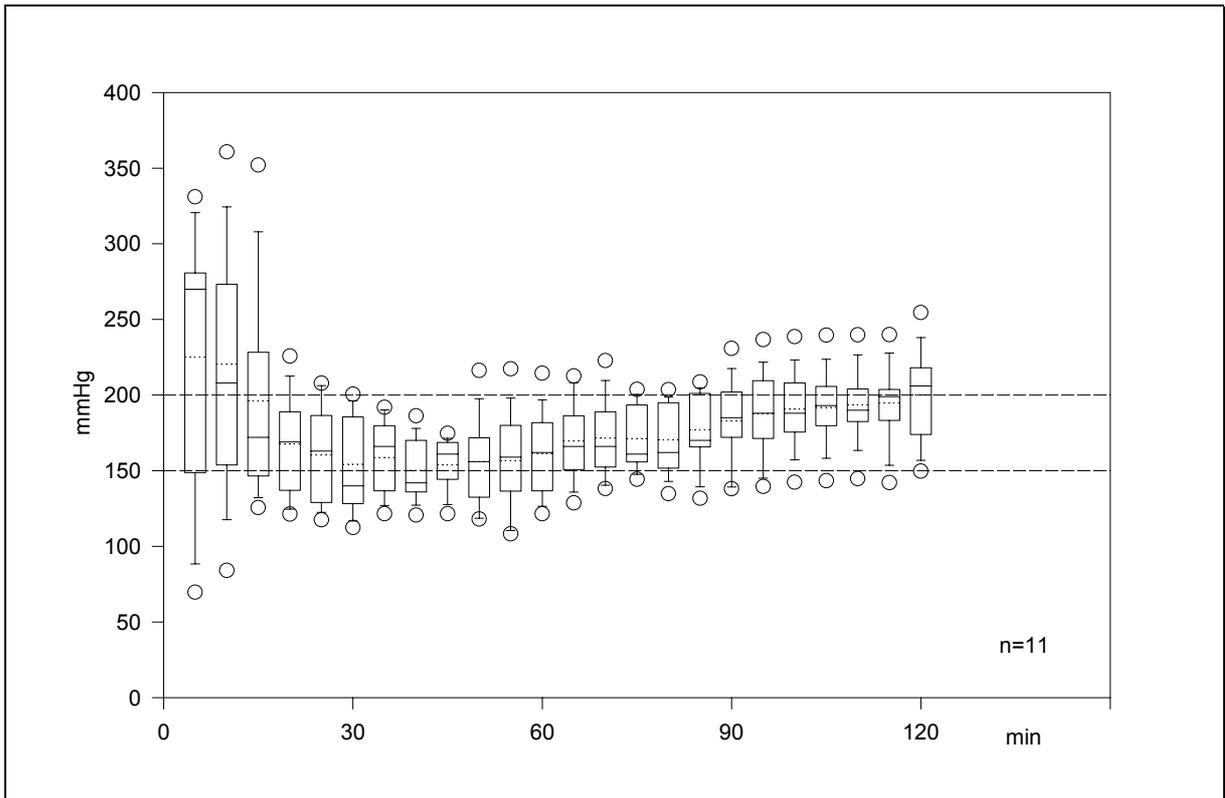
Im Oxygenator des Perfusionssystems wurde der Sauerstoffgehalt des Perfusatbluts künstlich erhöht. Eine nahezu vollständige Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im Perfusat wurde angestrebt. Zusätzlich boten wir dem Organ im Blutplasma physikalisch gelösten Sauerstoff an. Daher wählten wir für den Sauerstoffpartialdruck einen Sollwert von 150 bis 200 mmHg. Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins beträgt, abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert, dem  $p\text{CO}_2$  und dem 2,3-DPG Gehalt, bei einem Sauerstoffpartialdruck von 80 mmHg, zwischen 92 % und 98 %. Bei einem Partialdruck von 60 mmHg sinkt die Sättigung auf 84 % bis 89 %. Werte von weniger als 80 mmHg versuchten wir deshalb zu vermeiden, was bei fast allen Versuchen in den einzelnen Versuchsgruppen auch gelang. Versuche bei denen der Sauerstoffpartialdruck während der ex-vivo Perfusion über länger als zehn Minuten unter 80 mmHg absank, wurden nicht gewertet. Um von Beginn an im Perfusatblut eine optimale Sauerstoffsättigung zu erreichen, wurde es kurz vor dem Versuchsstart mit Sauerstoff begast. Da hier noch kein Sauerstoff verbraucht wurde, stiegen die Werte manchmal auf deutlich mehr als 200 mmHg an. Kurz nach dem Start fielen die Werte dann in den Sollwertbereich ab, wo sie dann gut steuerbar bis zum Ende des Versuchs gehalten werden konnten.



**Abbildung 21: Arterieller Sauerstoffpartialdruck während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

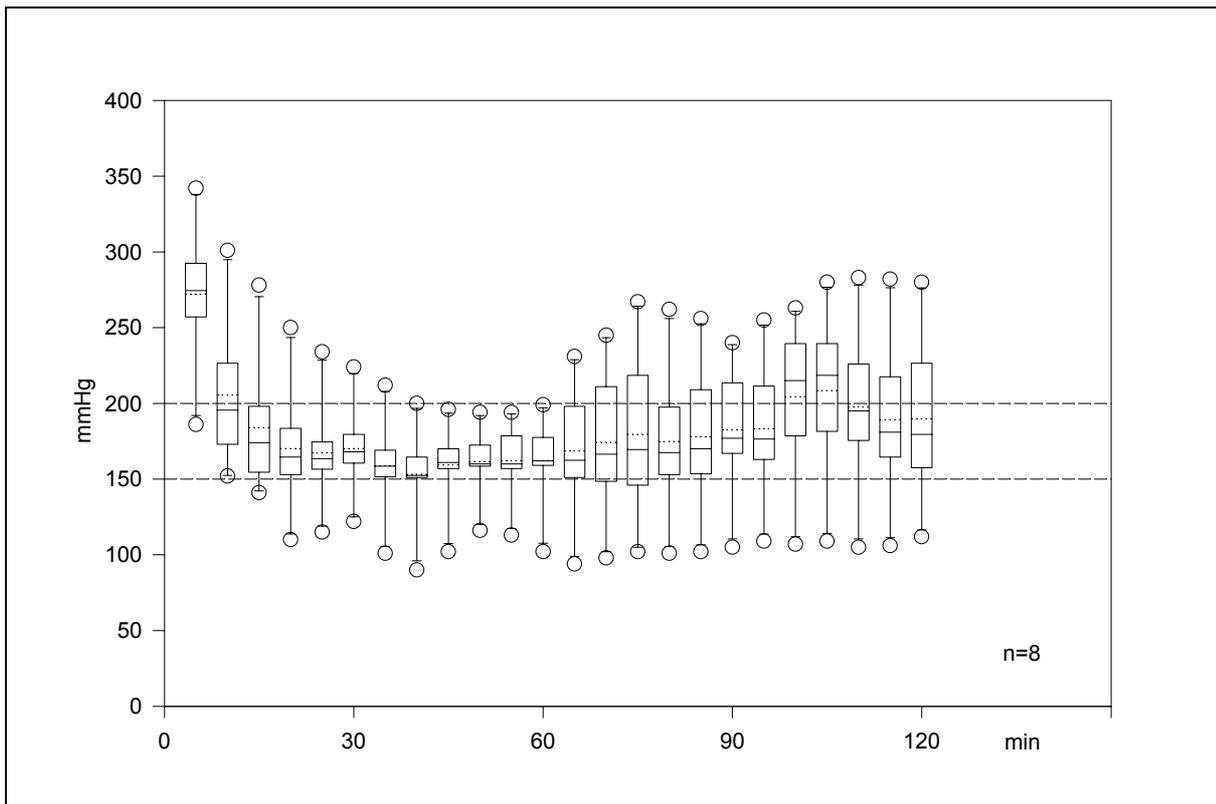
In der Versuchsgruppe 1 pendelte sich der arterielle Sauerstoffpartialdruck schnell in den gewünschten Bereich zwischen 150 und 200 mmHg ein. Ein Wert nach 5 Minuten lag bei 393 mmHg, fiel nach 10 Minuten auf 173 mmHg. Die anderen Werte blieben im weiteren Verlauf der Versuche relativ konstant. Insgesamt konnte bis zum Ende der Versuche ein leichter Anstieg des  $pO_2$  über 200 mmHg beobachtet werden. Es kam nie zu einem kritischen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks auf Werte von weniger als 80 mmHg (s. Abbildung 22).

Die Mittelwerte lagen nach 30 Minuten bei 176 mmHg ( $\sigma \pm 26,8$ ), nach 60 Minuten bei 187 mmHg ( $\sigma \pm 18,6$ ), nach 90 Minuten bei 201 mmHg ( $\sigma \pm 27,2$ ) und nach 120 Minuten bei 215 mmHg ( $\sigma \pm 27,3$ ). Die restlichen Mittelwerte können ebenso wie die dazugehörigen Standardabweichungen und Standardfehler im Anhang nachgelesen werden.



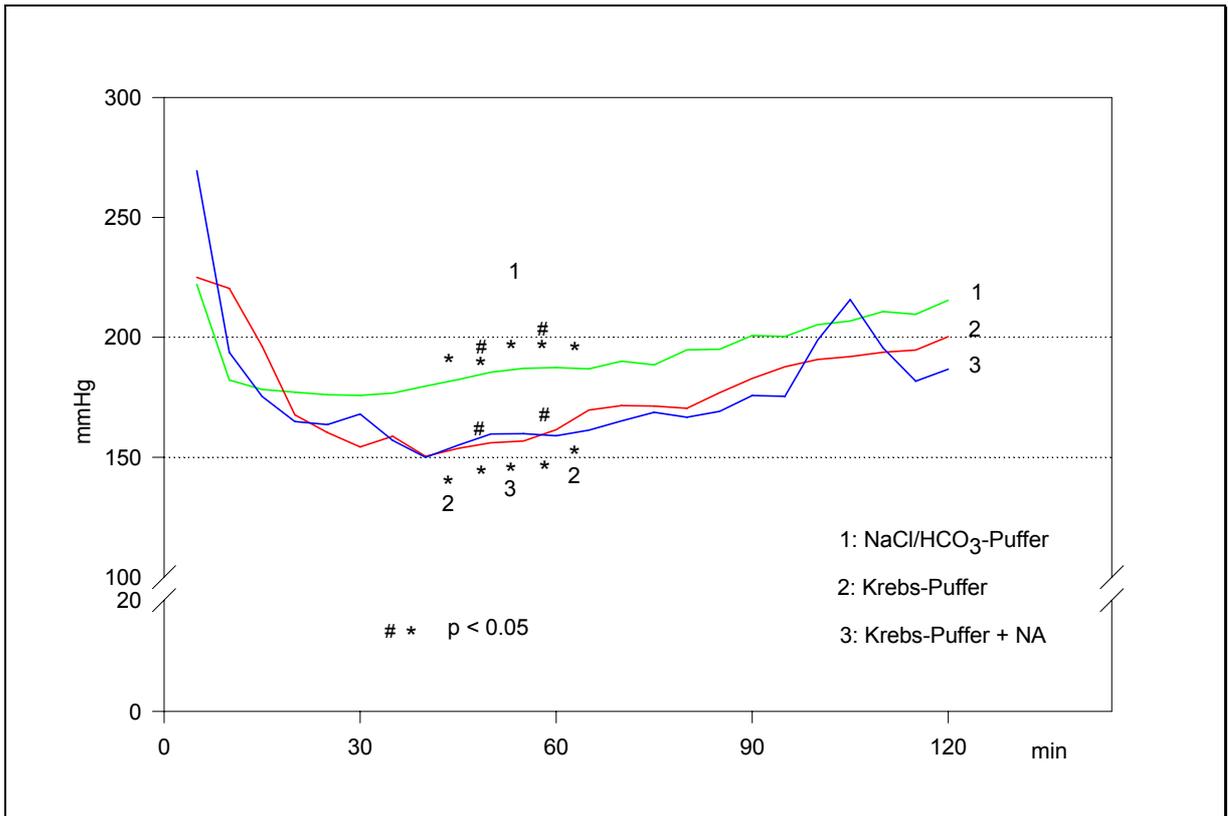
**Abbildung 22: Arterieller Sauerstoffpartialdruck während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

In der Gruppe 2 wurde der Sollwertbereich des arteriellen  $pO_2$  in der Mehrheit der Versuche nach ca. 15 Minuten erreicht. In den ersten 5 Minuten lag der Wert bei einem Versuch im Mittel bei 68 mmHg. Er stieg dann jedoch schnell an und erreichte nach 10 Minuten 81 mmHg und nach 15 Minuten 123 mmHg. Der Versuch wurde für die Auswertung verwendet. Insgesamt lagen die meisten Werte in den ersten 60 Minuten an der unteren Grenze des Sollwertbereichs, um dann bis an die obere Grenze anzusteigen. Abgesehen von den Anfangswerten wurde der Maximalwert am Ende der Perfusion erreicht und betrug 200 mmHg ( $\sigma \pm 31,1$ ), der Minimalwert lag mit 150 mmHg ( $\sigma \pm 20,7$ ) bei 40 Minuten. Die übrigen gemessenen Mittelwerte lagen nach 30 Minuten bei 154 mmHg ( $\sigma \pm 31,8$ ). Nach 60 Minuten lag der Wert bei 161 mmHg ( $\sigma \pm 29,3$ ). Er stieg dann nach 90 Minuten auf 161 mmHg ( $\sigma \pm 29,3$ ) und nach 120 Minuten auf 200 mmHg ( $\sigma \pm 31,1$ ) an. Die restlichen Mittelwerte sind ebenso wie die dazugehörigen Standardabweichungen und Standardfehler im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 23: Arterieller Sauerstoffpartialdruck während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

Ebenso wie in den anderen Gruppen lagen auch in der Versuchsgruppe 3 die arteriellen Sauerstoffpartialdrücke in den erste fünf Minuten deutlich oberhalb vom Sollwertbereich. Die Werte waren hier im Mittel bei 269 mmHg ( $\sigma \pm 66,1$ ). Fielen dann schnell in den gewünschten Bereich und blieben dort in großer Mehrzahl bis zum Ende der Versuche konstant. Es gab zwei Versuche, die fast die gesamte Zeit über außerhalb des Sollwertbereichs lagen. Beide Versuche wurden gewertet, da bei beiden das Hauptkriterium einer ausreichenden Sauerstoffversorgung gewährleistet war. Die Minimalwerte des einen Versuchs lagen nach 40 Minuten bei 90 mmHg und nach 45 Minuten bei 92 mmHg. Die Maximalwerte des anderen Versuchs lagen bei 267 mmHg nach 75 Minuten und bei 322 mmHg nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion. Die Mittelwerte aller gewerteten Versuche in der Gruppe 3 lagen nach 30 Minuten bei 168 mmHg ( $\sigma \pm 31,4$ ) und fielen nach 60 Minuten leicht auf 159 mmHg ( $\sigma \pm 33,1$ ) ab. Danach stiegen sie wieder leicht an und erreichten 176 mmHg ( $\sigma \pm 47,9$ ).



**Abbildung 24: Vergleich der Mittelwerte der arteriellen Sauerstoffpartialdrücke der drei Versuchsgruppen während 120 Minuten ex-vivo Perfusion. Raum zwischen der gepunktete Linien: Sollwertbereich**

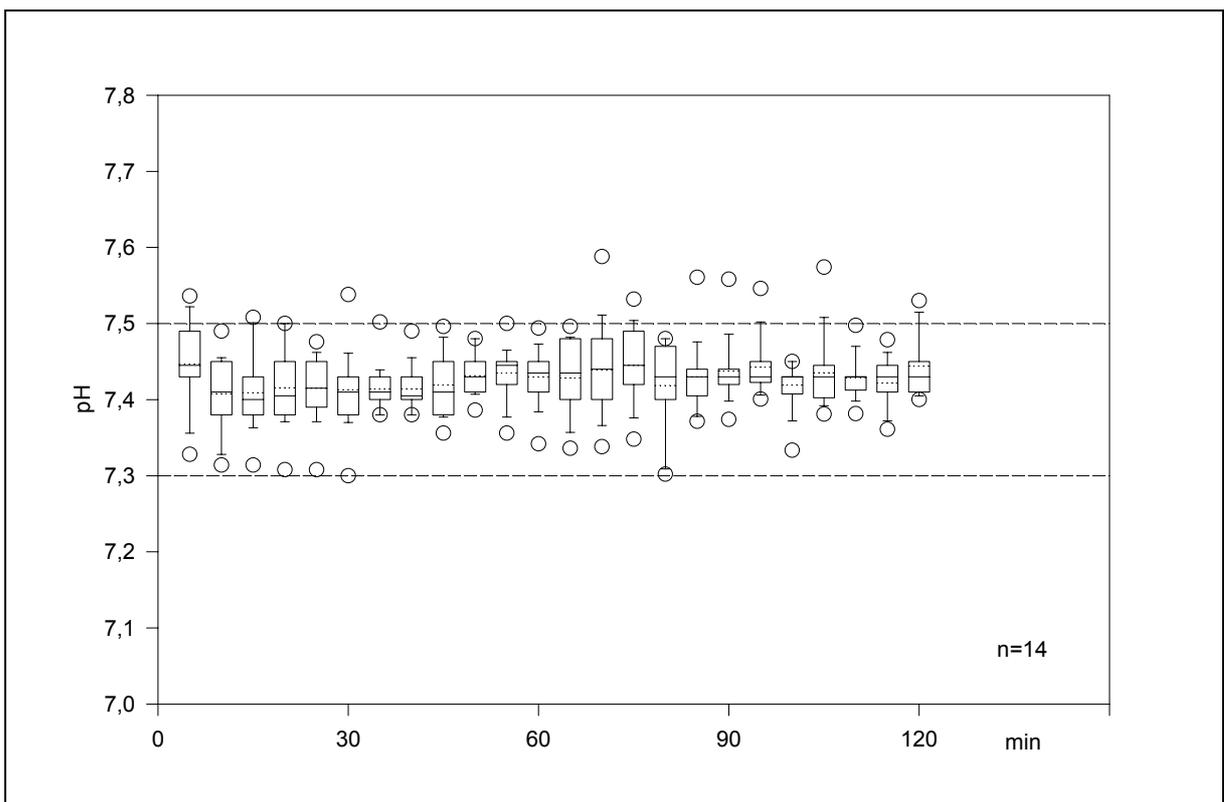
nach 90 Minuten und 187 mmHg ( $\sigma \pm 71,3$ ) am Ende der Versuche. Lässt man die Fünffminutenwerte außer Acht, so lag das Maximum der Mittelwerte mit 216 mmHg ( $\sigma \pm 45,0$ ) bei 105 Minuten. Das Minimum lag nach 40 Minuten bei 150 mmHg ( $\sigma \pm 35,5$ ). Die Restlichen Mittelwerte sind ebenso wie die dazugehörigen Standardabweichungen und Standardfehler im Anhang aufgeführt.

Vergleicht man die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen, so wird deutlich, dass die meiste Zeit kein signifikanter Unterschied in den arteriellen Sauerstoffpartialdrücken bestand. Die statistische Analyse der gesammelten Daten ergab lediglich in dem Zeitraum 40 Minuten bis 60 Minuten nach Perfusionsbeginn einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe 1 und den Gruppen 2 bzw. 3 ( $p < 0,05$ : Gruppe 1 vs. 2 nach 40 Minuten, Gruppe 1 vs. 2 und Gruppe 1 vs. 3 nach 45 Minuten, Gruppe 1 vs. 3 nach 50 Minuten, Gruppe 1 vs. 2 und Gruppe 1 vs. 3 nach 55 Minuten, Gruppe 1 vs. 2 nach 60 Minuten). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 3 bestand nie.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass die Sauerstoffversorgung der perfundierten Organe zu jedem Zeitpunkt in allen Gruppen gewährleistet wurde. Die geringen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2 bzw. 3 sind angesichts nahezu vollständiger Hämoglobinsättigung unter diesen Sauerstoffpartialdrücken als nicht relevant zu bewerten.

### 3.1.4 pH

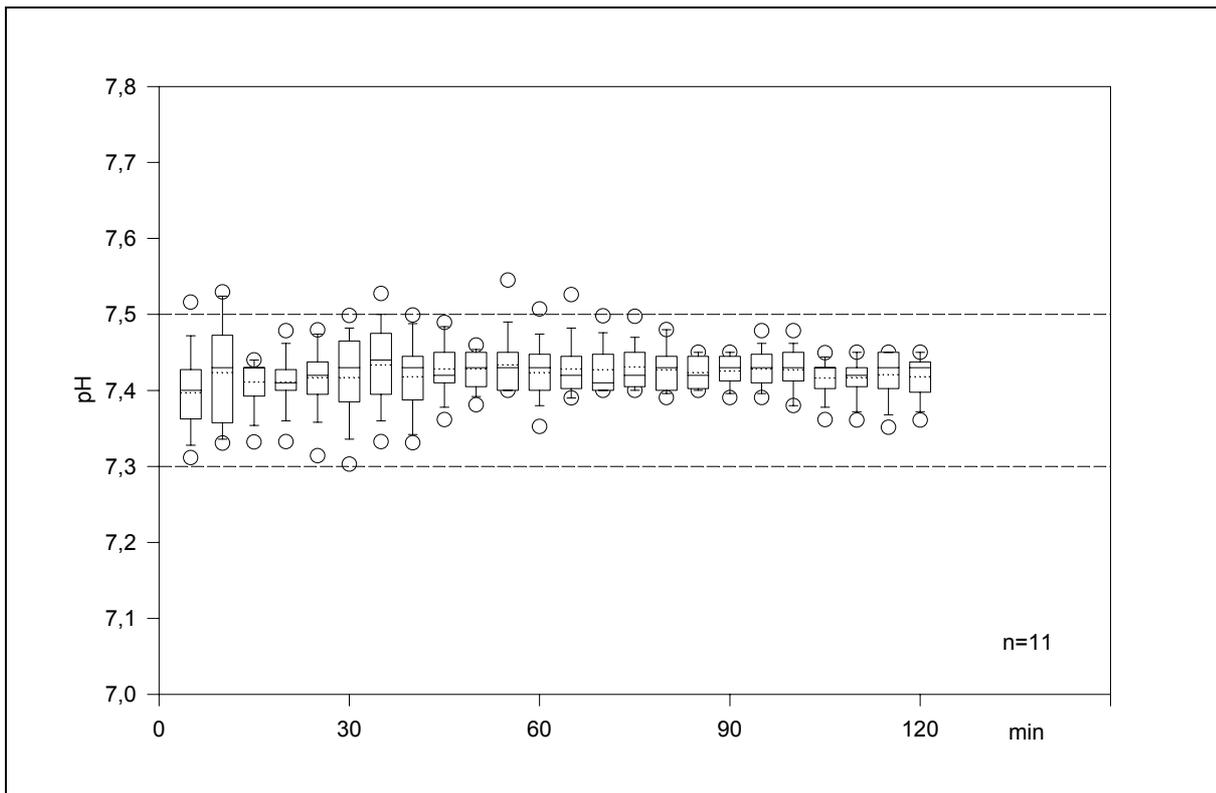
Der pH-Wert wurde durch den Zusatz von Kohlendioxid über den Oxygenator und durch die kontinuierliche Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  über einen Perfusor konstant gehalten. Um den pH-Wert im physiologischen Bereich zwischen 7,38 und 7,42 zu halten, war es gelegentlich notwendig korrigierend einzugreifen. Das geschah durch eine Änderung der Kohlendioxidkonzentration im Oxygenator. Als Sollwertbereich erschien uns ein Intervall zwischen 7,30 und 7,50 ein angemessener Kompromiss zwischen technischer Machbarkeit und der Schaffung möglichst physiologischer Bedingungen zu sein. Dabei wurden Extremwerte außerhalb dieser Grenzen bis zu einem Zeitraum von 15 Minuten toleriert. Versuche bei denen der pH-Wert über einen längeren Zeitraum entgleiste wurden nicht gewertet.



**Abbildung 25: pH-Wert während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

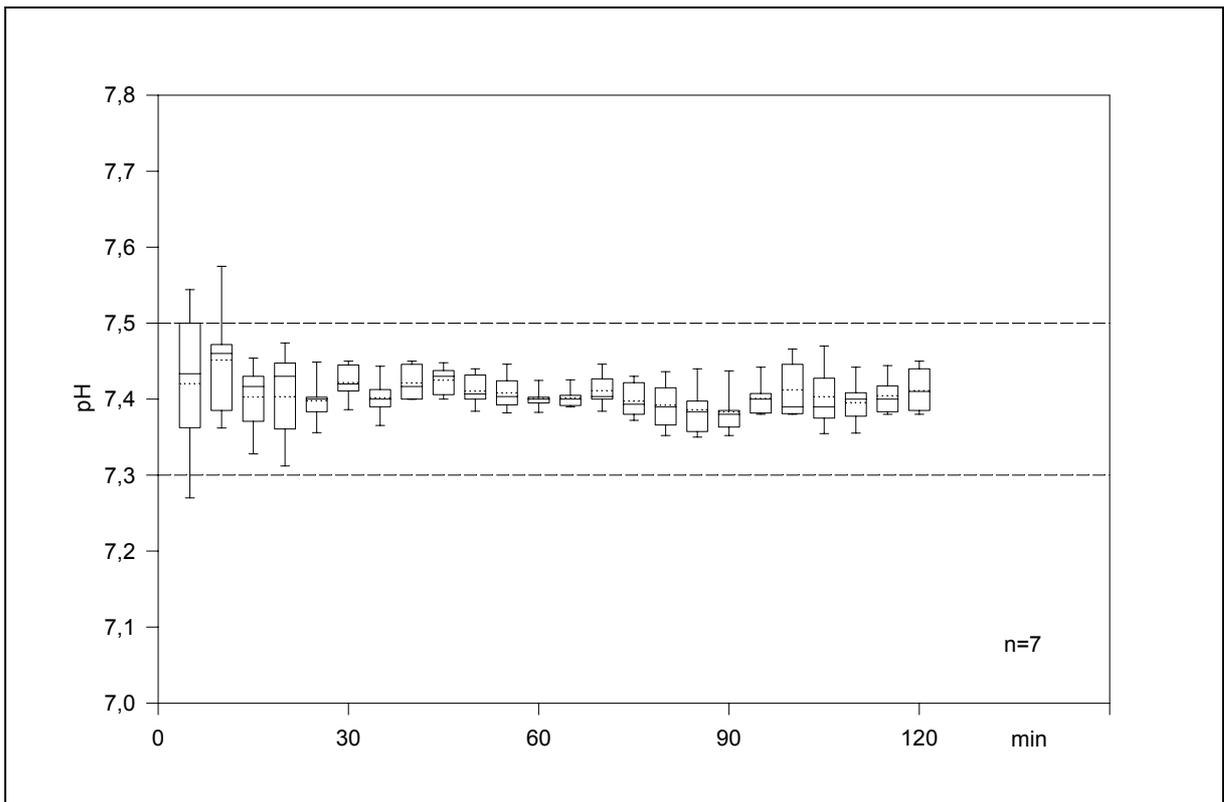
In der ersten Versuchsgruppe lagen die pH-Werte zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten von fast allen gewerteten Versuchen innerhalb des Sollwertbereichs.

Nach 30 Minuten lag der pH-Wert im Mittel bei 7,41 ( $\sigma \pm 0,6$ ), nach 60 Minuten bei 7,43 ( $\sigma \pm 0,4$ ), nach 90 Minuten bei 7,44 ( $\sigma \pm 0,5$ ) und nach 120 Minuten ebenfalls bei 7,44 ( $\sigma \pm 0,5$ ). Der Mittelwert aller gemessenen Werte aller Versuche lag in dieser Gruppe bei 7,43 ( $\sigma \pm 0,5$ ). Die restlichen Mittelwerte sind ebenso wie die dazugehörigen Standardabweichungen im Anhang nachzulesen.



**Abbildung 26: pH-Wert während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

In der Gruppe zwei lagen die gemessenen Werte über den gesamten Versuchszeitraum von 120 Minuten ideal im Sollwertbereich. Der pH-Wert lag nach 30 Minuten bei 7,42 ( $\sigma \pm 0,06$ ). Nach 60 Minuten war der Mittelwert 7,42 ( $\sigma \pm 0,04$ ), nach 90 Minuten 7,43 ( $\sigma \pm 0,02$ ) und nach 120 Minuten 7,42 ( $\sigma \pm 0,03$ ). Der Mittelwert aller gemessenen Werte über 120 Minuten betrug in der zweiten Gruppe 7,42 ( $\sigma \pm 0,04$ ). Im Anhang sind die restlichen Messwerte tabellarisch dargestellt.

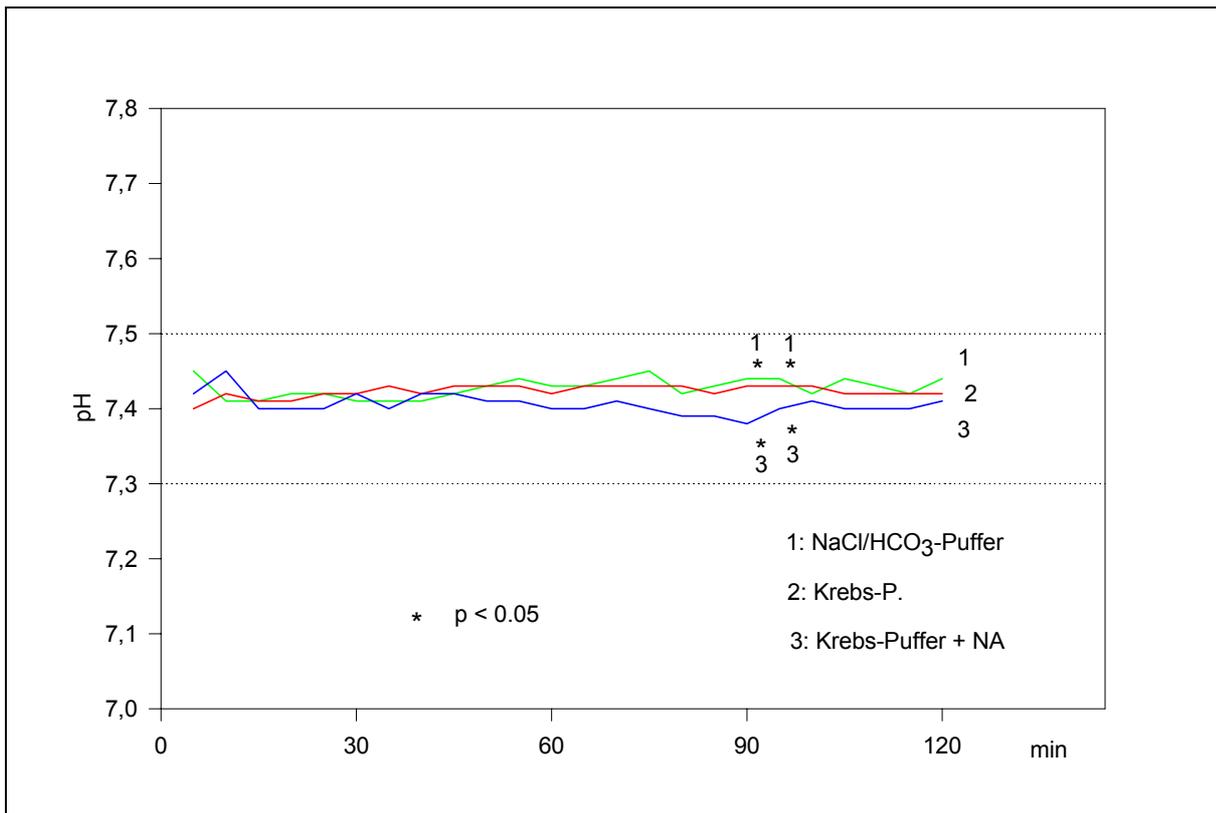


**Abbildung 27: pH-Wert während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

Abgesehen von ein paar kleineren Schwankungen zu Beginn der Versuche blieben in der Gruppe 3 alle Werte im Sollwertbereich. Der pH-Wert lag nach 30 Minuten bei 7,42 ( $\sigma \pm 0,02$ ), nach 60 Minuten bei 7,40 ( $\sigma \pm 0,01$ ), nach 90 Minuten bei 7,38 ( $\sigma \pm 0,03$ ) und nach 120 Minuten bei 7,41 ( $\sigma \pm 0,03$ ). Bildet man den Mittelwert aus allen, während des Versuchszeitraums von 120 Minuten gemessenen Werte, so betrug dieser 7,41 ( $\sigma \pm 0,03$ ). Die Daten zu den übrigen Messzeitpunkten können im Anhang nachgelesen werden.

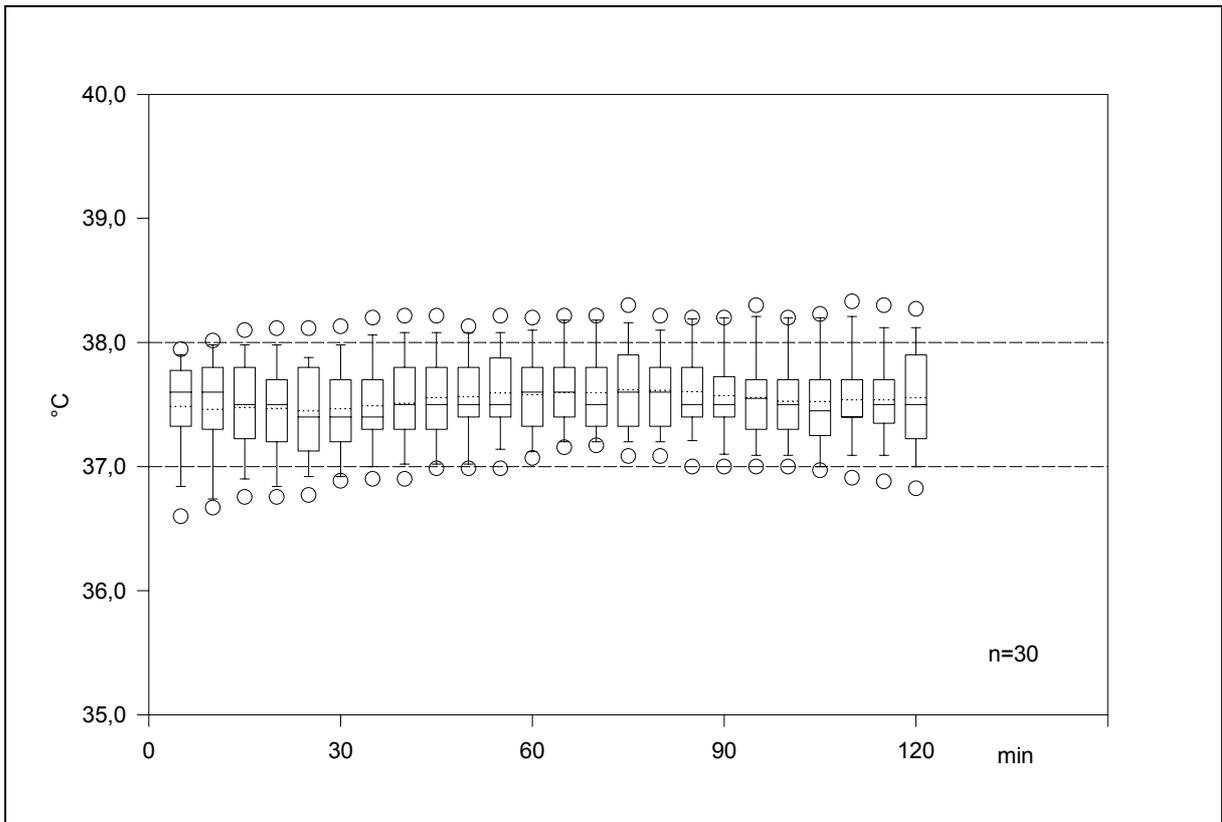
Im direkten Vergleich der drei Versuchsgruppen erkennt man, dass sich bis auf zwei Messzeitpunkte nach 95 bzw. 95 Minuten, keine signifikanten Unterschiede ergaben. Die Mittelwerte lagen hier bei 7,44 und 7,44 in der Gruppe 1 und bei 7,38 und 7,40 in der Gruppe 3.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass sich die pH-Werte über den gesamten Versuchszeitraum in allen Gruppen im physiologischen Bereich bewegten und dass im Vergleich zwischen den Gruppen keine relevanten Unterschiede festgestellt werden konnten.



**Abbildung 28: Vergleich der Mittelwerte der pH-Werte der drei Versuchsgruppen während 120 Minuten ex-vivo Perfusion. Raum zwischen der gepunktete Linien: Sollwertbereich**

### 3.1.5 Temperatur



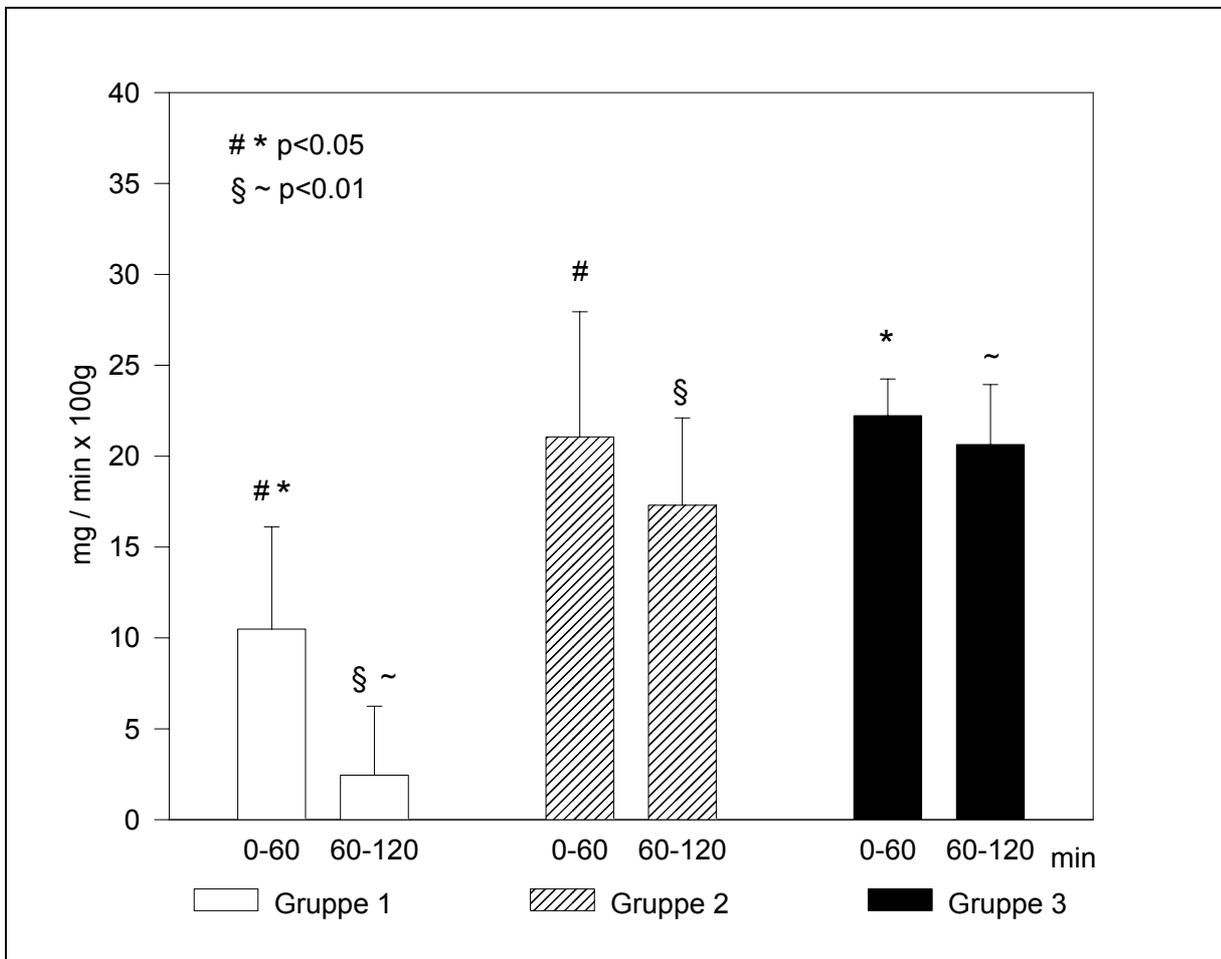
**Abbildung 29: Temperatur des Wasserbeckens während 120 Minuten Perfusion (Alle drei Gruppen). Gestrichelte Linien: Sollwertbereich. Gepunktete Linien: Mittelwerte. Durchgezogene Linie: Median**

Die Temperaturwerte waren für alle drei Gruppen gleich ( $p < 0,001$ ). Sie wurden deshalb in Abbildung 29 zusammengefasst. Die Messsonde befand sich zwar im Wasserbecken, jedoch war die Temperaturdifferenz zum perfundierten Organ kleiner als  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Diese Ergebnisse zeigen, dass die Umgebungstemperatur bei allen Versuchen und in allen drei Versuchsgruppen optimal zwischen  $37$  und  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingestellt war. Der Mittelwert aller Messungen aus allen Versuchsgruppen betrug  $37,5^{\circ}\text{C}$ , die Standardabweichung lag bei  $0,36\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Einzelnen Werte der drei Gruppen sind im Anhang nachzulesen.

## 3.2 Untersuchungen im Perfusat

### 3.2.1 Glukoseverbrauch

Die Glukosekonzentration im Perfusat wurde zu Beginn, nach 60 Minuten und am Ende jedes Versuchs bestimmt. Da die Ausgangswerte unterschiedlich waren, musste als Erstes die Differenz ausgerechnet werden. Der Glukoseverbrauch durch Blutzellen (durchschnittlich  $191 \mu\text{g}/\text{dl}\cdot\text{min}$ ) wurde abgezogen. Anschließend wurde das Ergebnis mit dem Perfusatvolumen, dem Organgewicht des Darms und dem Zeitraum zwischen den zwei Messungen verrechnet. Die so erreichte Einheit  $[\text{mg}/\text{min}\cdot 100\text{g}]$  ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse.



**Abbildung 30: Glukoseverbrauch pro Minute durch das Organ während der ex-vivo Perfusion. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf 100g Organgewicht hochgerechnet. Gruppe 1: n=14, Gruppe 2 n= 11, Gruppe 3 n=8**

In der Gruppe 1 (n=14) lag der Glukoseverbrauch während den ersten 60 Minuten im Mittel bei 10,5 mg/min·100g ( $\sigma\pm 5,6$ ). In den zweiten 60 Minuten fiel der Wert dann auf 2,4 mg/min·100g ( $\sigma\pm 3,8$ ) ab, in einigen Versuchen näherte er sich Null. Der Glukoseverbrauch war somit in dieser Gruppe von vornherein geringer als in den beiden anderen Gruppen und fiel in den zweiten 60 Minuten noch weiter ab.

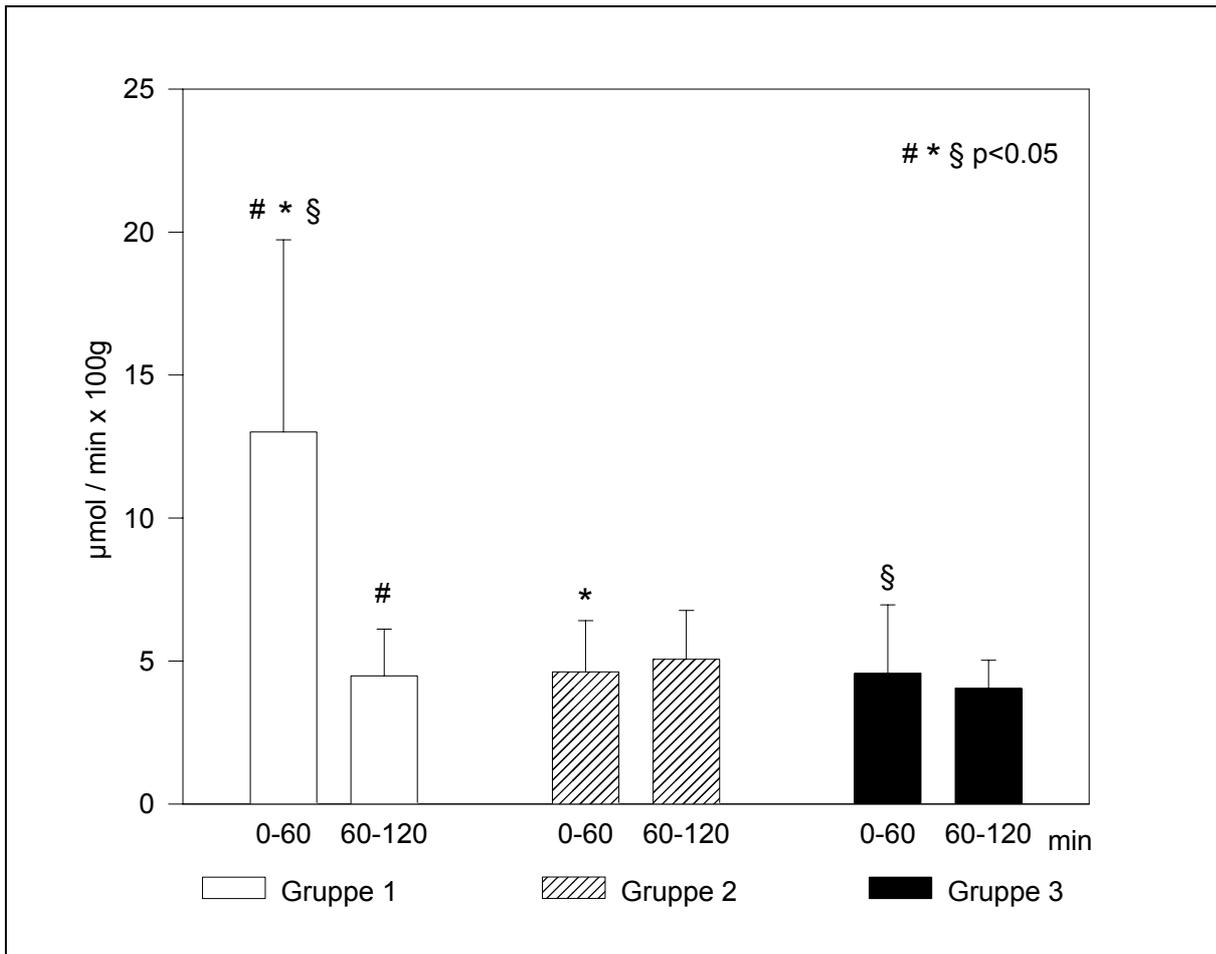
In den beiden anderen Gruppen war der Glukoseverbrauch deutlich höher. In der Gruppe 2 (n=11) war der Mittelwert der ersten 60 Minuten 21,1 mg/min·100g ( $\sigma\pm 6,9$ ), in den zweiten 60 Minuten war der Wert leicht zurückgegangen und lag dann bei 17,3 mg/min·100g ( $\sigma\pm 4,7$ ). Die Werte in der Gruppe 3 (n=8) waren sehr ähnlich. Der Glukoseverbrauch lag hier in den ersten 60 Minuten bei 22,2 mg/min·100g ( $\sigma\pm 2,0$ ), in den zweiten 60 Minuten lag der Mittelwert bei 20,6 mg/min·100g ( $\sigma\pm 3,3$ ).

In der statistischen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1 und den beiden anderen Gruppen während den ersten 60 Minuten. Dieser Unterschied im Glukoseverbrauch wurde während den zweiten 60 Minuten noch größer. Zwischen den Gruppen 2 und 3 gab es nie einen statistisch signifikanten Unterschied.

### **3.2.2 Laktatproduktion**

Zur Berechnung der Laktatproduktion wurden am Beginn des Versuchs, nach 60 Minuten und nach 120 Minuten Blutproben entnommen. Ebenso wie bei der Bestimmung des Glukoseverbrauchs wurde zunächst die Differenz zwischen den Werten bestimmt und der Anteil der Blutzellen an der Laktatproduktion abgezogen. Der ermittelte Wert wurde dann noch auf das Perfusatvolumen, das Organgewicht und auf die verstrichene Zeit zwischen den Messungen bezogen. Das Ergebnis wurde letztendlich mit der Einheit [ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$ ] angegeben.

Die Streuung der Werte für die Laktatproduktion der Gruppe 1 war sehr hoch. Sie lag mit dem Mittelwert mehr als doppelt so hoch wie bei den anderen Messungen. Die Laktatproduktion erreichte während den ersten 60 Minuten im Mittel einen Wert von

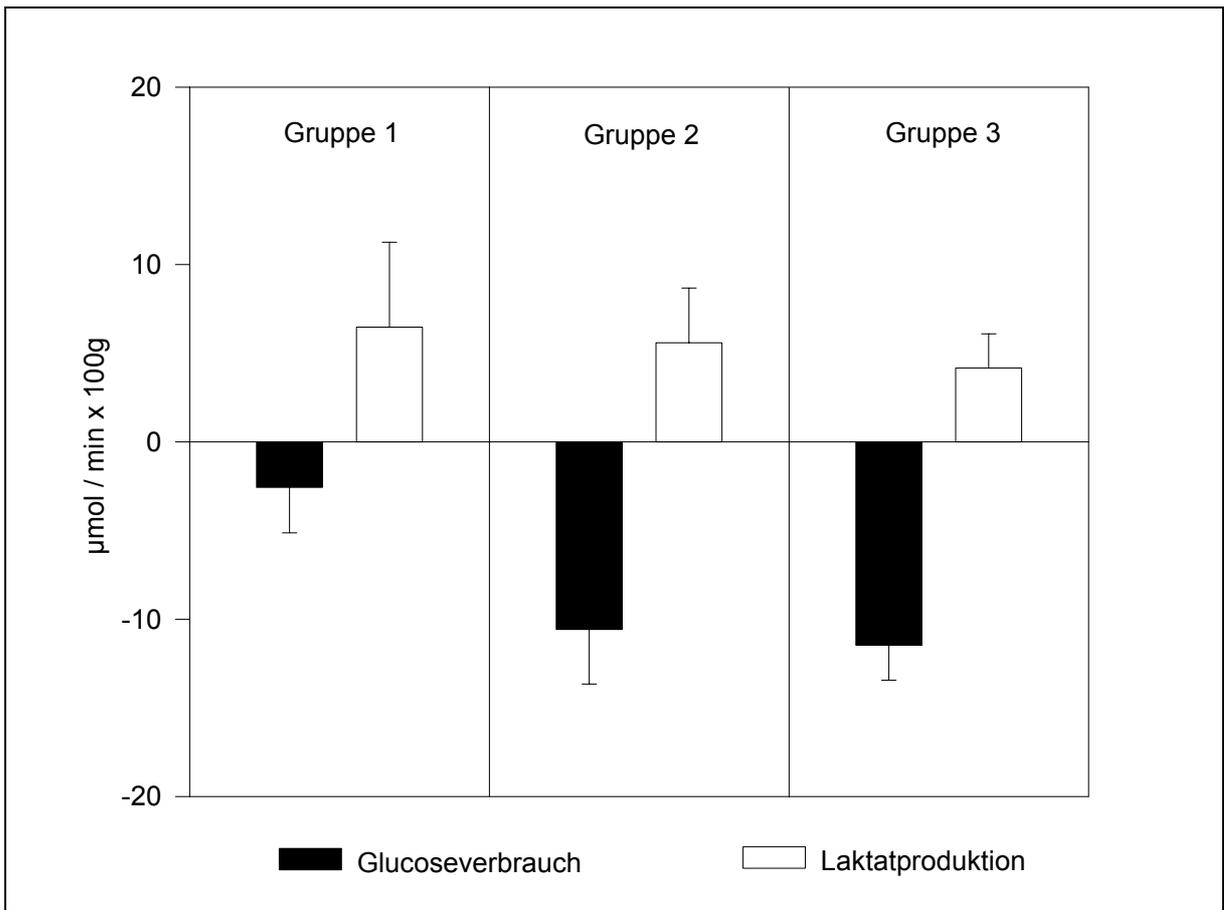


**Abbildung 31: Laktatproduktion pro Minute durch das Darmsegment während der ex-vivo Perfusion. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf 100g Organgewicht hochgerechnet. Gruppe 1: n=13, Gruppe 2 n= 15, Gruppe 3 n=10**

13,0  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 6,7$ ) und sank in den zweiten 60 Minuten auf 4,5  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,6$ ). Diese Diskrepanz zwischen dem 60 Minuten- und dem 120 Minutenwert lässt sich am ehesten auf folgende Weise erklären: Der hohe Wert der ersten 60 Minuten ist die Folge einer länger anhaltenden Ischämie des Organs mit vermehrter anaerober Glykolyse. Während den zweiten 60 Minuten kam es in dieser Gruppe zu einem deutlichen Flussabfall auf so geringe Werte, dass kaum mehr Laktat aus dem Organ ausgewaschen werden konnte. Hinzu kam eine verminderte Laktatproduktion durch den fortgeschrittener Zelluntergang in der Mukosa nach etwa 45 minütiger Ischämie.

In den beiden anderen Gruppen lagen die Werte für die Laktatproduktion sowohl in den ersten 60 Minuten, als auch in den zweiten 60 Minuten auf konstant niedrigem

Niveau. In der Gruppe 1 war der Wert im Mittel  $4,6 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,8$ ) während den ersten 60 Minuten und  $5,1 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,7$ ) während den zweiten 60 Minuten. Die Laktatproduktionswerte der Gruppe 3 waren ähnlich: In den ersten 60 Minuten lag der Mittelwert bei  $4,6 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 2,4$ ). Während den zweiten 60 Minuten fiel der Wert leicht auf  $4,0 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,0$ ).



**Abbildung 32: Verstoffwechslung von Glukose während 120 Minuten ex-vivo Perfusion. Die gleichen Einheiten für den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion erlauben den direkten Vergleich**

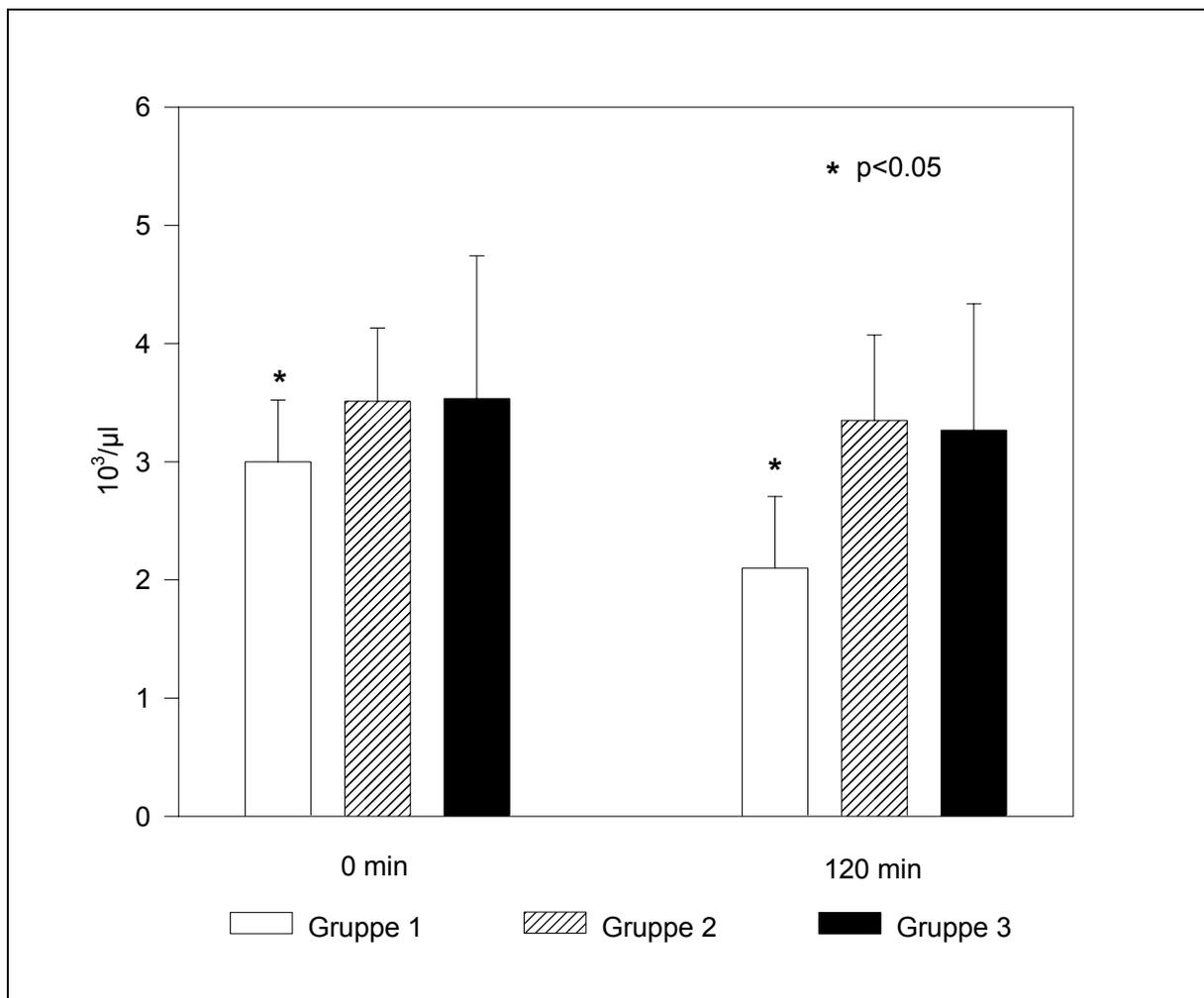
Vergleicht man den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion während des gesamten Versuchs über 120 Minuten (Abbildung 32), so erkennt man hier ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen der Gruppe 1 und den beiden anderen Gruppen.

In der Gruppe 1 wurden während des Versuchs  $2,6 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 2,6$ ) Glukose verbraucht und  $7,9 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 6,8$ ) Laktat wurden produziert. In der Gruppe 2

wurden  $10,6 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 3,3$ ) Glukose verbraucht und nur  $5,6 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 3,3$ ) Laktat produziert. Der Glukoseverbrauch in der Gruppe 3 betrug während der 120 Minuten des Versuchs im Mittel  $11,5 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 2,0$ ). Der Laktatanstieg lag hier bei  $4,2 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,9$ ).

Hieraus wird ersichtlich, dass die Glukose in den Gruppen 2 und 3 vornehmlich aerob und damit sehr effizient verstoffwechselt wurde. In der Gruppe 1 war der Glukoseverbrauch von vornherein geringer und zusätzlich wurde die Energie fast ausschließlich durch anaerobe Glykolyse gewonnen.

### 3.2.3 Leukozyten



**Abbildung 33: Leukozytenzahlen zu Beginn und am Ende der Perfusion. Nur die Abnahme der Leukozyten in Gruppe 1 ist statistisch signifikant; Gruppe 1:  $n=10$ , Gruppe 2:  $n=11$ , Gruppe 3:  $n=8$**

Die Zahl an Leukozyten im Perfusat wurde vor und nach jedem Versuch bestimmt. Die Unterschiede der Ausgangswerte in den jeweiligen Versuchsgruppen waren nicht groß genug um sie als statistisch signifikant zu werten. Die Mittelwerte der Leukozytenzahlen waren zu Beginn 3000 / $\mu$ l ( $\sigma\pm 520$ ) für die Gruppe 1, 3500 / $\mu$ l ( $\sigma\pm 620$ ) für die Gruppe 2 und 3500 / $\mu$ l ( $\sigma\pm 1210$ ) für die Gruppe 3.

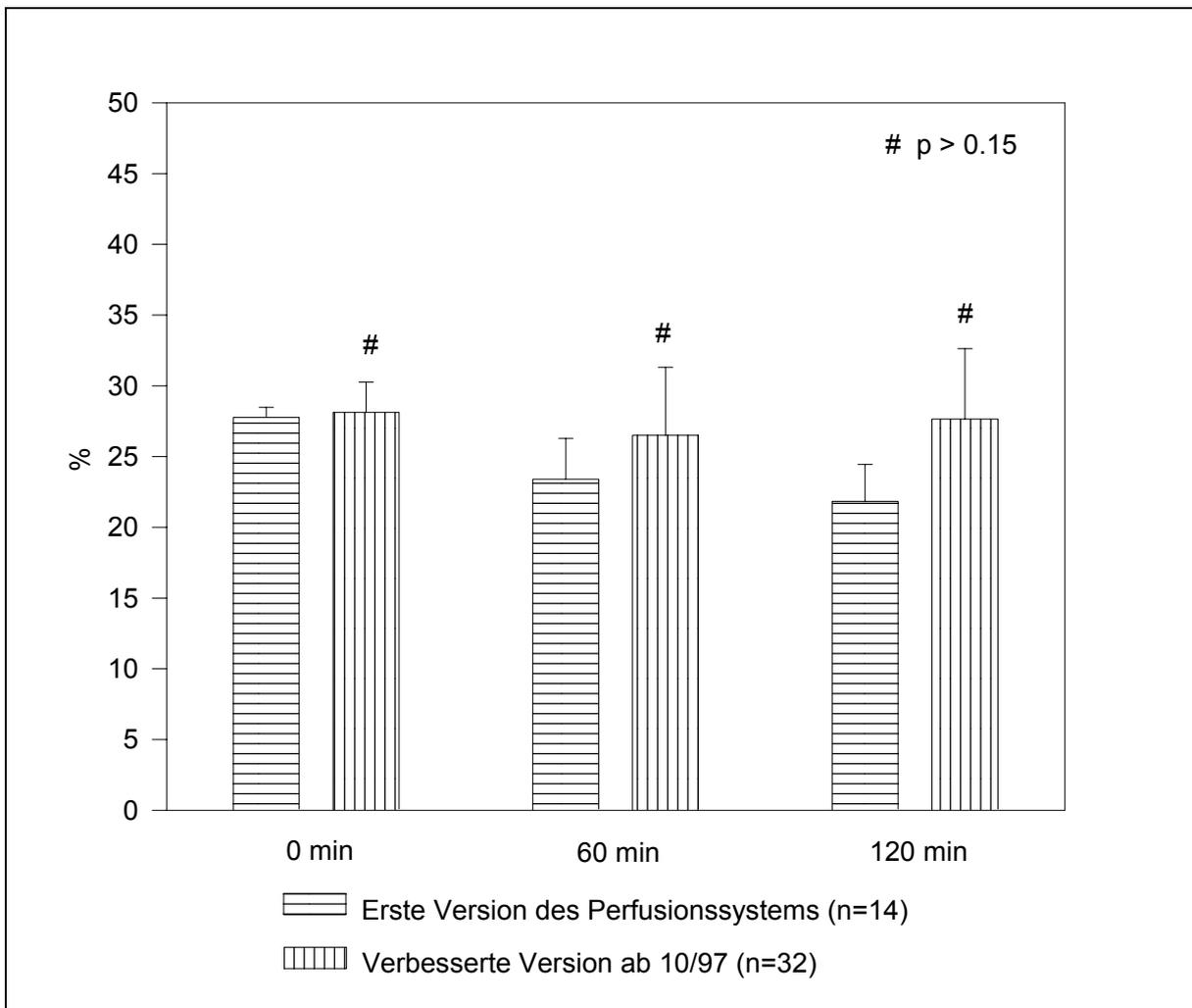
Die 120 Minutenwerte lagen in der Gruppe 1 bei 2100 / $\mu$ l ( $\sigma\pm 610$ ), in der Gruppe 2 bei 3400 / $\mu$ l ( $\sigma\pm 720$ ) und in der Gruppe 3 bei 3300 / $\mu$ l ( $\sigma\pm 1070$ ). Im paarweisen Vergleich der Endwerte waren hier nur die Gruppen 1 vs. 2 signifikant unterschiedlich ( $p<0,01$ ).

Die Veränderungen der Leukozytenwerte während des Versuchs waren nur in der Gruppe 1 statistisch signifikant. Die Abnahme der Leukozyten betrug hier 900/ $\mu$ l in 120 Minuten ( $p<0,01$ ), dies entspricht einer Verminderung von etwa 32 %.

Man kann also sagen, dass die Leukozytenwerte in den Gruppen 2 und 3 weitgehend konstant blieben. Daraus kann man indirekt auf eine relativ geringe Aktivierung von Endothel und Leukozyten durch die künstliche Perfusion des Organs rückschließen.

Anders verhielt es sich in der Gruppe 1. Hier kam es zu einer deutlichen Abnahme der Leukozyten im Perfusatblut. Dieser Verlust von fast 1/3 der zu Beginn vorhandenen Leukozyten lässt sich am besten durch eine massive Emigration von Zellen in das perfundierte Organ erklären. Diese These wird durch die spätere histologische Untersuchung der Dünndärme aus der Gruppe 1, bei denen reichlich Leukozyten im interstitiellen Bindegewebe der Mukosazotten zu sehen waren, unterstützt (s. Kap. 3.3).

### 3.2.4 Hämatokrit



**Abbildung 34: Der Hämatokrit blieb bei allen Versuchsgruppen während der Perfusion mit dem verbesserten System konstant**

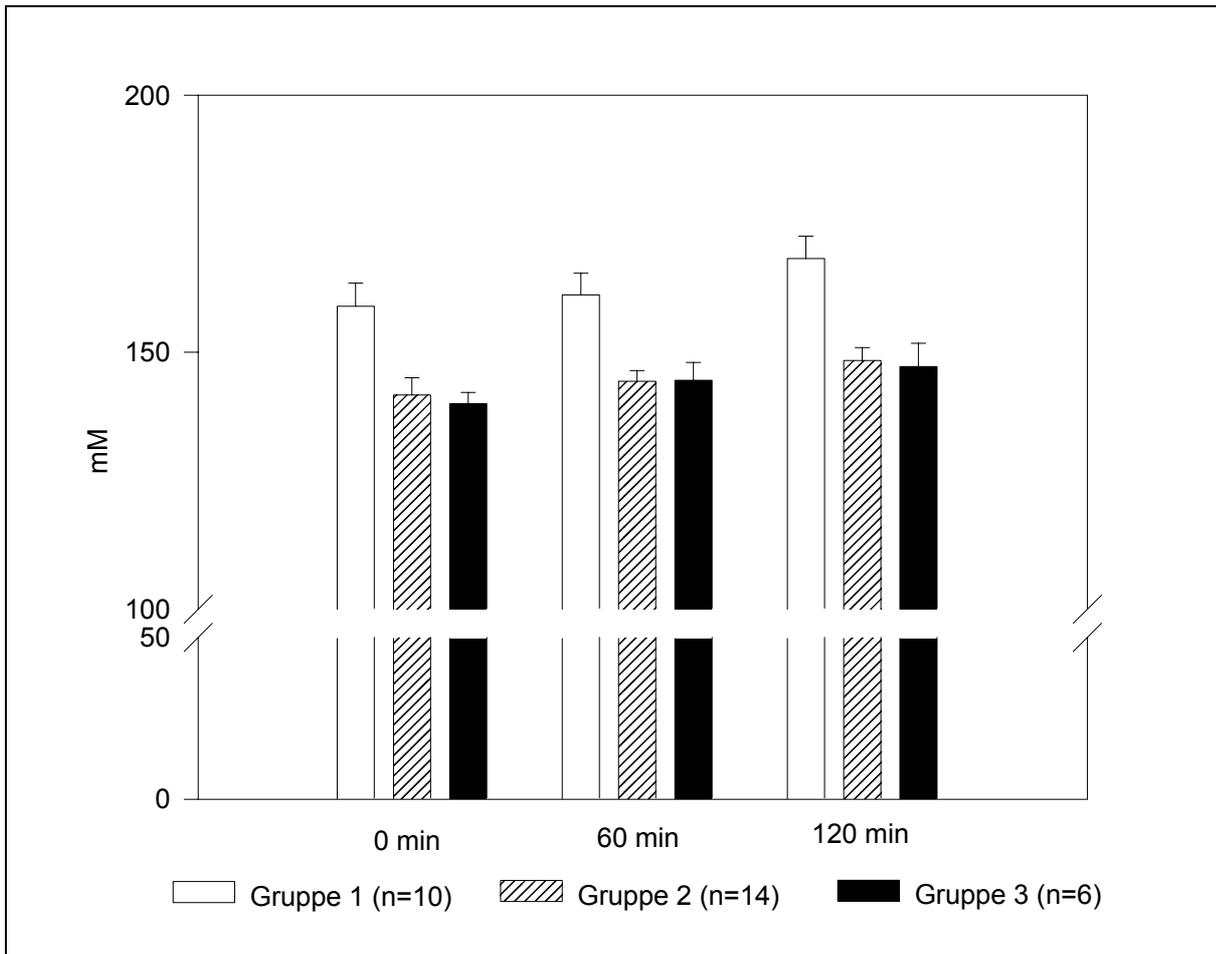
Der Hämatokritwert des Perfusatbluts wurde drei mal, zu den Zeitpunkten Null, 60 Minuten und 120 Minuten gemessen. Veränderungen des Hämatokritwertes während der Perfusion waren vor allem von der Bauart des verwendeten Systems abhängig. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden nicht (Daten nicht gezeigt), sie wurden deshalb zusammengefasst und in Abbildung 34 gegen die Hämatokritwerte bei Verwendung des ersten Perfusionssystems aufgetragen. Der Ausgangswert lag für Gruppe A bei 27,8 % ( $\sigma \pm 0,72$ ), für Gruppe B bei 28,1 % ( $\sigma \pm 2,1$ ), ein signifikanter Unterschied bestand nicht. Im weiteren Verlauf kann man erkennen, dass der Hämatokrit in Gruppe A deutlich abfällt (0 Minuten vs. 120

Minuten:  $p < 0,001$ ), wohingegen die Werte in Gruppe B konstant bleiben. Die 60 Minutenwerte lagen für die Gruppe A im Mittel bei 23,4 % ( $\sigma \pm 2,9$ ), für die Gruppe B im Mittel bei 26,5 % ( $\sigma \pm 4,8$ ) und waren noch nicht signifikant unterschiedlich. Bei den 120 Minutenwerten lag der Hämatokritwert für die Gruppe A bei 21,8 % ( $\sigma \pm 2,6$ ), für die Gruppe B bei 27,6 % ( $\sigma \pm 4,9$ ). Die beiden Werte waren signifikant unterschiedlich ( $p < 0,01$ ).

Entscheidender Faktor für die Entwicklung des Hämatokritwertes über die 120 Minuten Perfusion war demnach der Grad der physikalischen Hämolyse, durch hämodynamisch ungünstig geformte Bestandteile des Systems. Faktoren, die einer Hämokonzentration und damit dem Hämatokritabfall entgegen wirkten, wie zum Beispiel die Verdunstung von freiem Wasser oder der Verlust von freier Flüssigkeit in das Darmlumen, waren vernachlässigbar klein. Das lässt sich an den relativ konstanten Natriumwerten und der gleichbleibenden Osmolarität erkennen.

Die in dieser Dissertation verwendeten Daten wurden alle mit dem neueren Perfusionssystem erhoben (Gruppe B).

### 3.2.5 Natrium



**Abbildung 35: Die Natriumkonzentration im Perfusat zu Beginn, nach 60 Minuten und nach 120 Minuten Perfusion. Höherer Ausgangswert in Gruppe 1 durch höhere Natriumkonzentration in der Hämodilutionslösung in dieser Gruppe.**

Für die Bestimmung des Natriumwertes wurden jeweils zu den Zeitpunkten Null, 60 Minuten und 120 Minuten Perfusion Blutproben entnommen. Die Ausgangswerte der Gruppe 2 (142 mM  $\sigma \pm 3,4$ ) und der Gruppe 3 (140 mM  $\sigma \pm 2,2$ ) waren nicht signifikant unterschiedlich. Der Vergleich der Gruppe 1 (159 mM  $\sigma \pm 4,5$ ) mit den Gruppen 2 und 3, ergab dagegen einen hochsignifikanten Unterschied (für beide  $p < 0,001$ ), der auch zu den weiteren Messzeitpunkten bestehen blieb. Der Grund war die höhere Natriumkonzentration (174mM) in der Hämodilutionslösung von Gruppe 1

Tabelle 3, S.34). Diese Konzentrationen waren notwendig, um die gleiche Osmolarität zu erreichen.

Nach 60 Minuten lagen die Natriumwerte in der Gruppe 1 bei 161 mM ( $\sigma \pm 4,2$ ), in der Gruppe 2 bei 144 mM ( $\sigma \pm 2,1$ ) und in der Gruppe 3 bei 145 mM ( $\sigma \pm 3,5$ ). Zwischen den Gruppen 2 und 3 gab es keinen signifikanten Unterschied.

Auch nach 120 Minuten lag zwischen diesen zwei Gruppen kein signifikanter Unterschied vor. Die Endwerte für Natrium waren 168 mM ( $\sigma \pm 4,4$ ) für die Gruppe 1, 148 mM ( $\sigma \pm 2,5$ ) für die Gruppe 2 und 147 mM ( $\sigma \pm 4,5$ ) für die Gruppe 3.

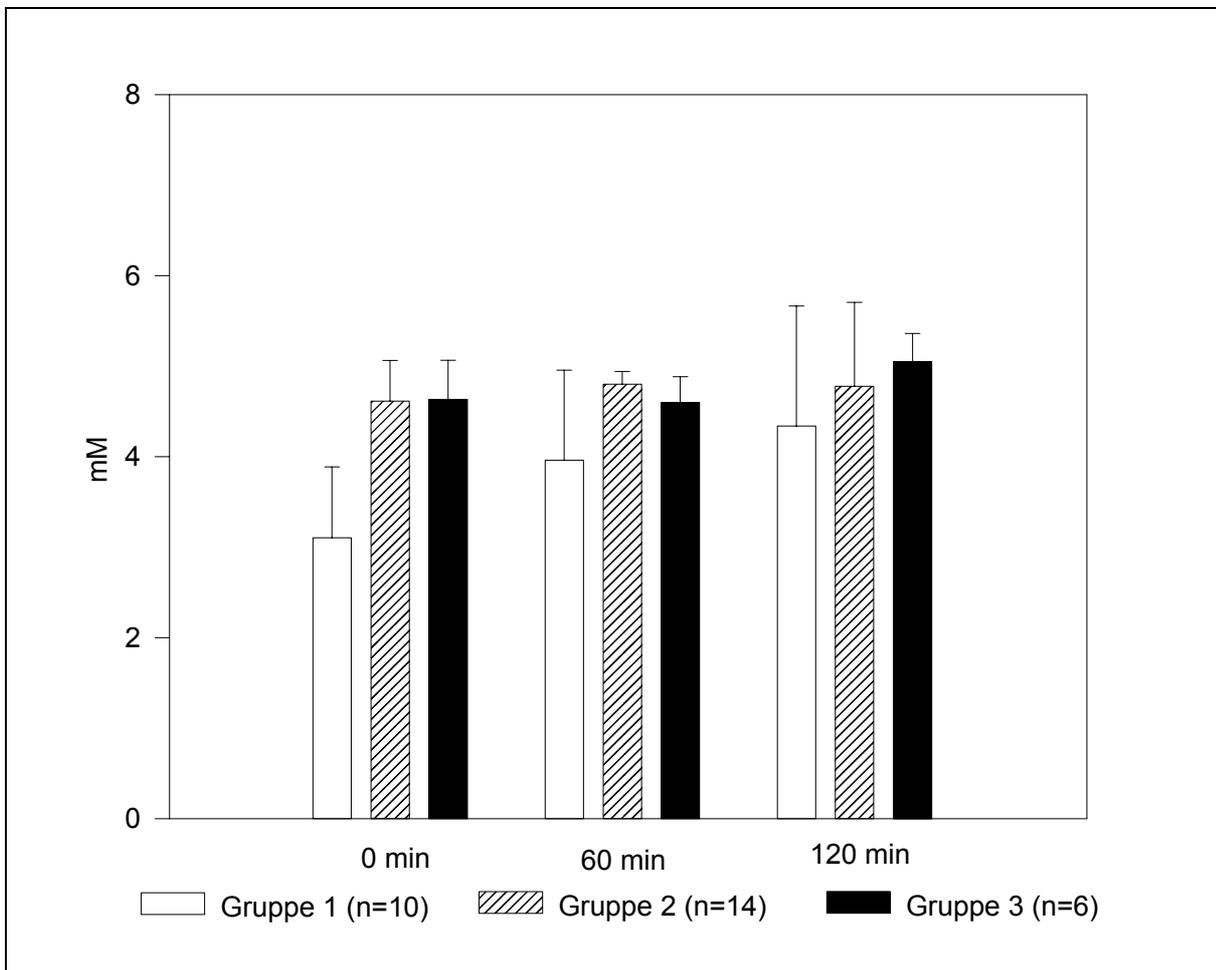
Der leichte Anstieg der Werte bis zum Ende des Versuchs in den Gruppen 2 und 3 war statistisch signifikant ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$ ). Die Werte blieben jedoch im physiologischen Bereich[22]. Der stärker ausgeprägte Anstieg in Gruppe 1 lässt sich am ehesten durch die, in dieser Gruppe besonders häufig und als besonders intensiv beobachtete Mukusekretion in das Darmlumen erklären. Dieser Mukus enthielt weniger Natrium als das Perfusatblut. Die Mukusekretion führte durch die Bindung von Flüssigkeit an Mukopolysaccharide zu einem Verlust von freiem Wasser und damit zu einem Hämatokritanstieg, einem Natriumanstieg und zu einem Anstieg der Osmolarität.

### **3.2.6 Kalium**

Für die Bestimmung des Kaliums wurden zu den drei bekannten Messzeitpunkten Blutproben entnommen. Der Ausgangswert der Gruppe 1 (3,1 mM  $\sigma \pm 0,78$ ) lag niedriger als der der Gruppen 2 und 3, da hier eine kaliumfreie Hämodilutionslösung verwendet wurde ( $p < 0,0001$ ). Die Anfangswerte der Gruppen 2 (4,6 mM  $\sigma \pm 0,45$ ) und 3 (4,6 mM  $\sigma \pm 0,43$ ) waren statistisch betrachtet gleich.

Das Kalium lag nach 60 Minuten Perfusion in der Gruppe 1 bei 4,0 mM ( $\sigma \pm 1,00$ ), in der Gruppe 2 bei 4,8 mM ( $\sigma \pm 0,14$ ) und in der Gruppe 3 bei 4,6 mM ( $\sigma \pm 0,28$ ). Nach 120 Minuten lagen die Werte bei 4,3 mM ( $\sigma \pm 1,33$ ) für die Gruppe 1, bei 4,8 mM ( $\sigma \pm 0,93$ ) für die Gruppe 2 und bei 5,1 mM ( $\sigma \pm 0,31$ ) für die Gruppe 3.

Bei den 60 und 120 Minutenwerten ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr.



**Abbildung 36: Die Kaliumkonzentration im Perfusat zu Beginn, nach 60 Minuten und nach 120 Minuten Perfusion. Stärkerer Kaliumanstieg in Gruppe 1, die Werte blieben jedoch für alle Gruppen weitgehend im Normbereich.**

Da die intrazelluläre Kaliumkonzentration 24mal höher ist als die extrazelluläre Kaliumkonzentration, kam es in allen Gruppen durch Hämolyse zu einem leichten Kaliumanstieg im Perfusatblut.

In der Gruppe 1 kam es durch einen erhöhten Verlust an freier Flüssigkeit (s. Kap. 3.2.5 Natrium) und über einen Netto-Efflux von Kalium aus den Zellen, zur Stabilisierung des elektro-chemischen Gleichgewichts zwischen Intra- und Extrazellulärraum, zu einem deutlicheren Anstieg. Die Werte lagen jedoch immer im Normbereich [22].

### 3.2.7 Osmolarität

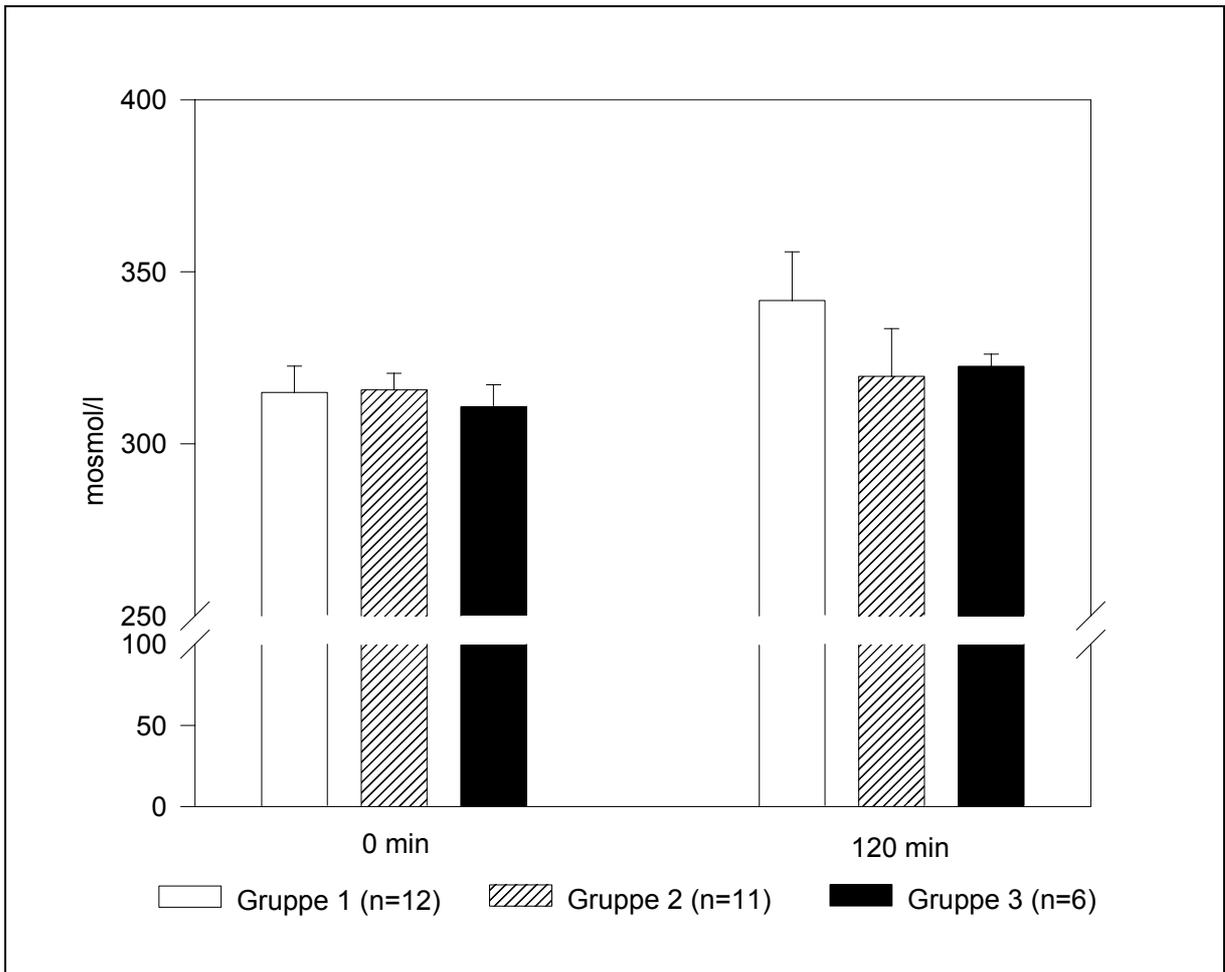


Abbildung 37: Die Osmolarität des Perfusats zu Beginn und nach 120 Minuten Perfusion.

Die Osmolarität des Perfusats wurde zu Beginn und am Ende eines jeden Versuchs bestimmt. Die Ausgangswerte waren statistisch betrachtet für alle Gruppen gleich. Der Mittelwert zu Beginn lag für die Gruppe 1 bei 315 mosmol/l ( $\sigma \pm 7,7$ ), für die Gruppe 2 bei 316 mosmol/L ( $\sigma \pm 4,9$ ) und für die Gruppe 3 bei 311 mosmol/l ( $\sigma \pm 6,4$ ).

Die Werte lagen nach 120 Minuten Perfusion etwas höher. Die Osmolarität betrug am Ende bei der Gruppe 1 342 mosmol/L ( $\sigma \pm 14,1$ ), bei der Gruppe 2 320 mosmol/L ( $\sigma \pm 13,9$ ) und bei der Gruppe 3 322 mosmol/L ( $\sigma \pm 3,5$ ). Ein signifikanter Unterschied bestand hier nur zwischen der Gruppe 1 und 3 ( $p < 0,01$ ).

Der Anstieg in Gruppe 2 war nicht signifikant, jener der Gruppe 1 war deutlich ( $p < 0,01$ ), der in der Gruppe 3 nur grenzwertig statistisch signifikant ( $p = 0,037$ ).

Die Ausgangswerte der Osmolarität wurden absichtlich etwas erhöht gewählt, um eine

osmotische Zellschwellung und eine damit verbundene Störung der Mikrozirkulation in der Mukosa des Dünndarms in jedem Fall zu vermeiden. Die Werte blieben in den Gruppen 2 und 3 weitgehend konstant. Lediglich in der Gruppe 1 kam es durch einen erhöhten Verlust an freier Flüssigkeit zu einem deutlichen Anstieg (s. Kap. 3.2.5 Natrium).

### 3.2.8 Sauerstoffverbrauch

Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden zu vier Messzeitpunkten arterielle und venöse Blutproben entnommen und der Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Aus der Differenz und dem Perfusionsfluss zum Messzeitpunkt wurde der Verbrauch bezogen auf das Organgewicht errechnet.

Diese Berechnung konnte in der Gruppe 1 aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden, da der Fluss in den meisten Versuchen dieser Gruppe nach 45 Minuten zu gering war, um plausible Werte errechnen zu können. Aufgrund der geringen arterio-venösen Sauerstoffdifferenz bei geringem Fluss, kann man jedoch vermuten, dass der Sauerstoffverbrauch nach der 45. Minute im Mittel deutlich unter  $1 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  gelegen haben muss. Der Verbrauch nach 15 Minuten war sehr variabel und lag im Mittel bei  $3,2 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma \pm 1,8$ ).

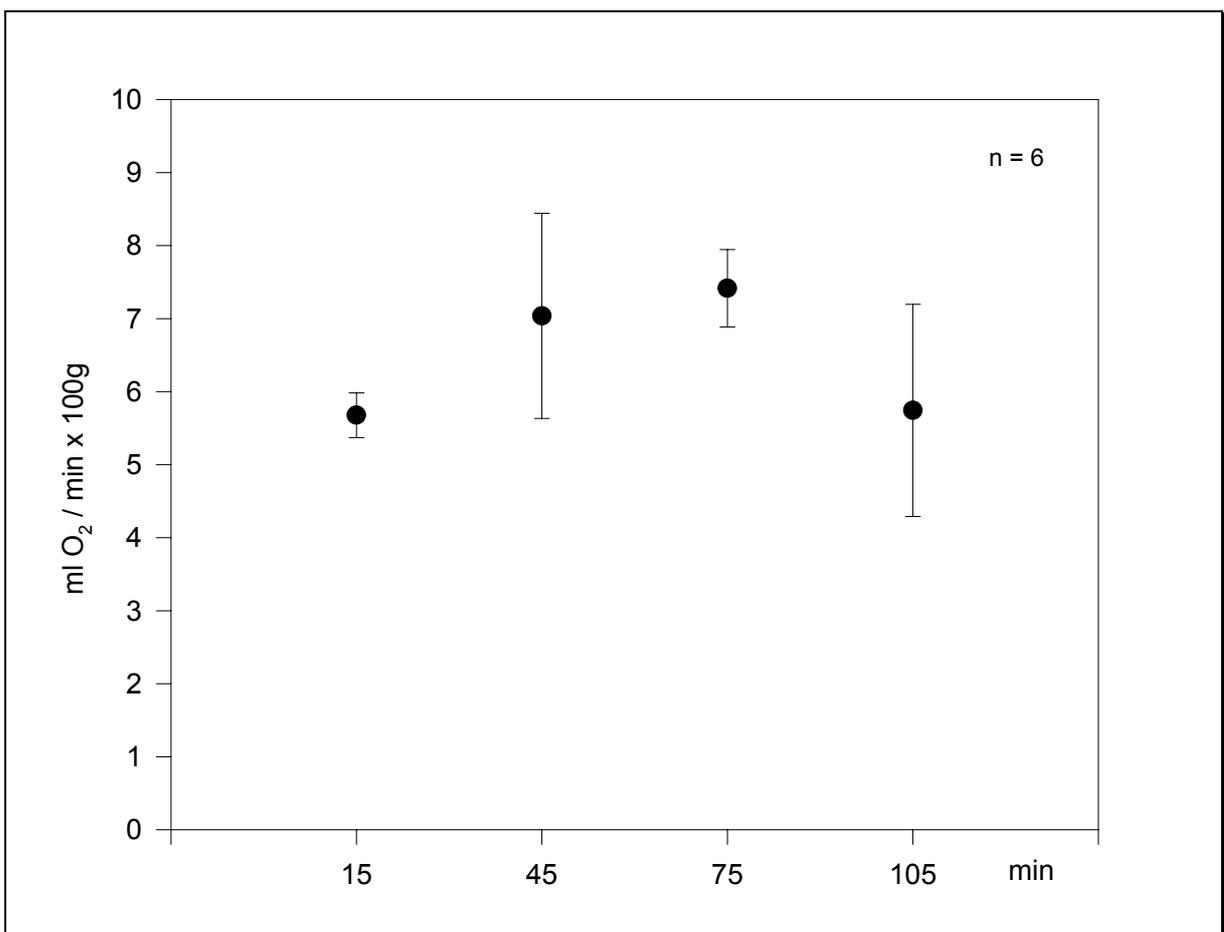
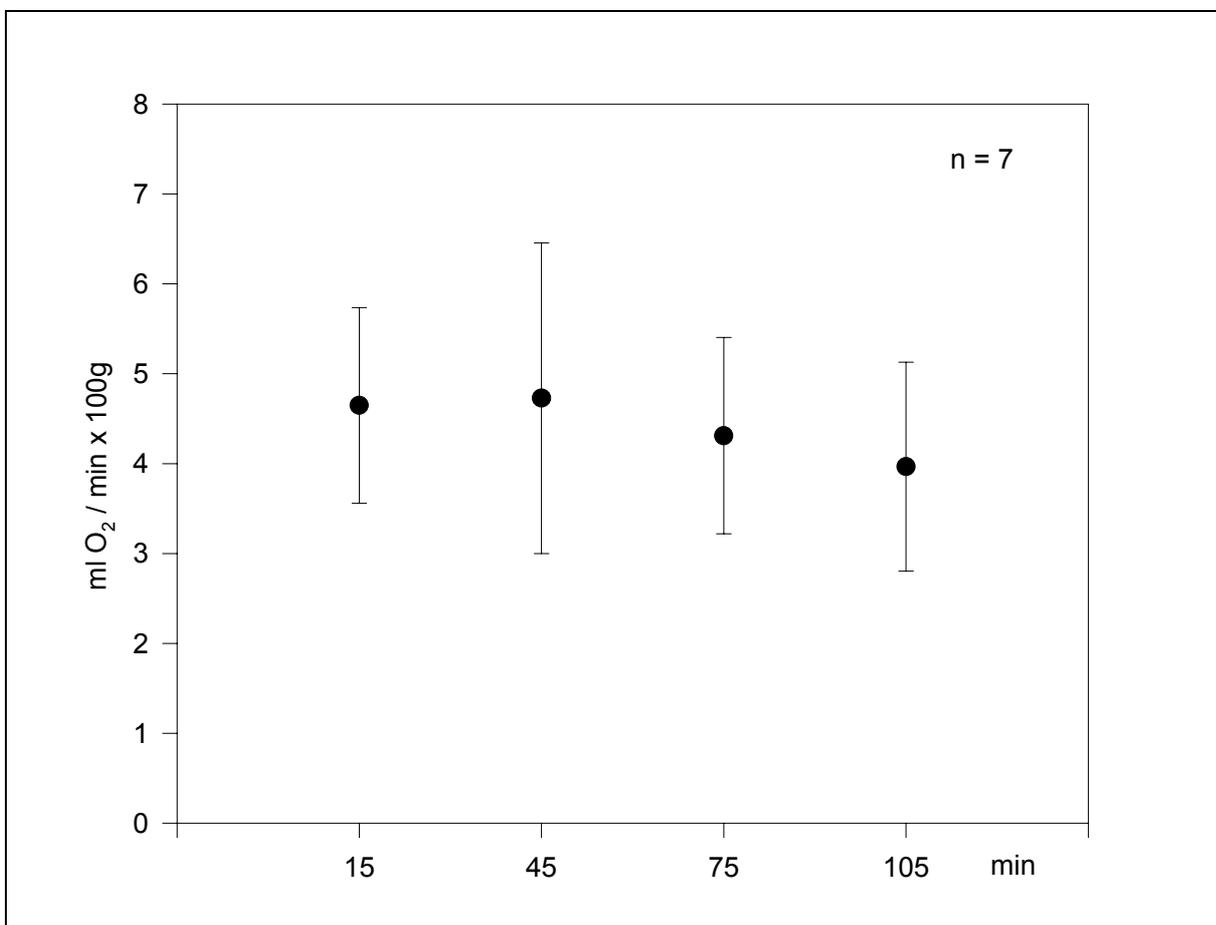


Abbildung 38: Sauerstoffverbrauch (Gruppe 2)

Der Sauerstoffverbrauch in der Gruppe 2 lag während der gesamten ex-vivo Perfusion, mit Werten um  $6 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  auf hochnormalem Niveau.

Der erste gemessene Wert nach 15 Minuten betrug im Mittel  $5,7 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 0,31$ ). Der Mittelwert lag nach 45 Minuten bei  $7,0 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,40$ ) und nach 75 Minuten bei  $7,4 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 0,53$ ). Am Ende der Versuche war der Wert wieder etwas gefallen und lag bei  $5,7 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 1,45$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der vier verschiedenen Messzeitpunkte bestand nicht.



**Abbildung 39: Sauerstoffverbrauch (Gruppe 3)**

Der Sauerstoffverbrauch in der Gruppe 3 lag mit Werten zwischen 4 und 5  $\text{mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  im Bereich anderer ex-vivo und in-vivo Studien [163,164,165,34,78] und ist somit als physiologisch anzusehen.

Der Verbrauch lag im Mittel nach 15 Minuten bei  $4,6 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma\pm 0,99$ ), nach

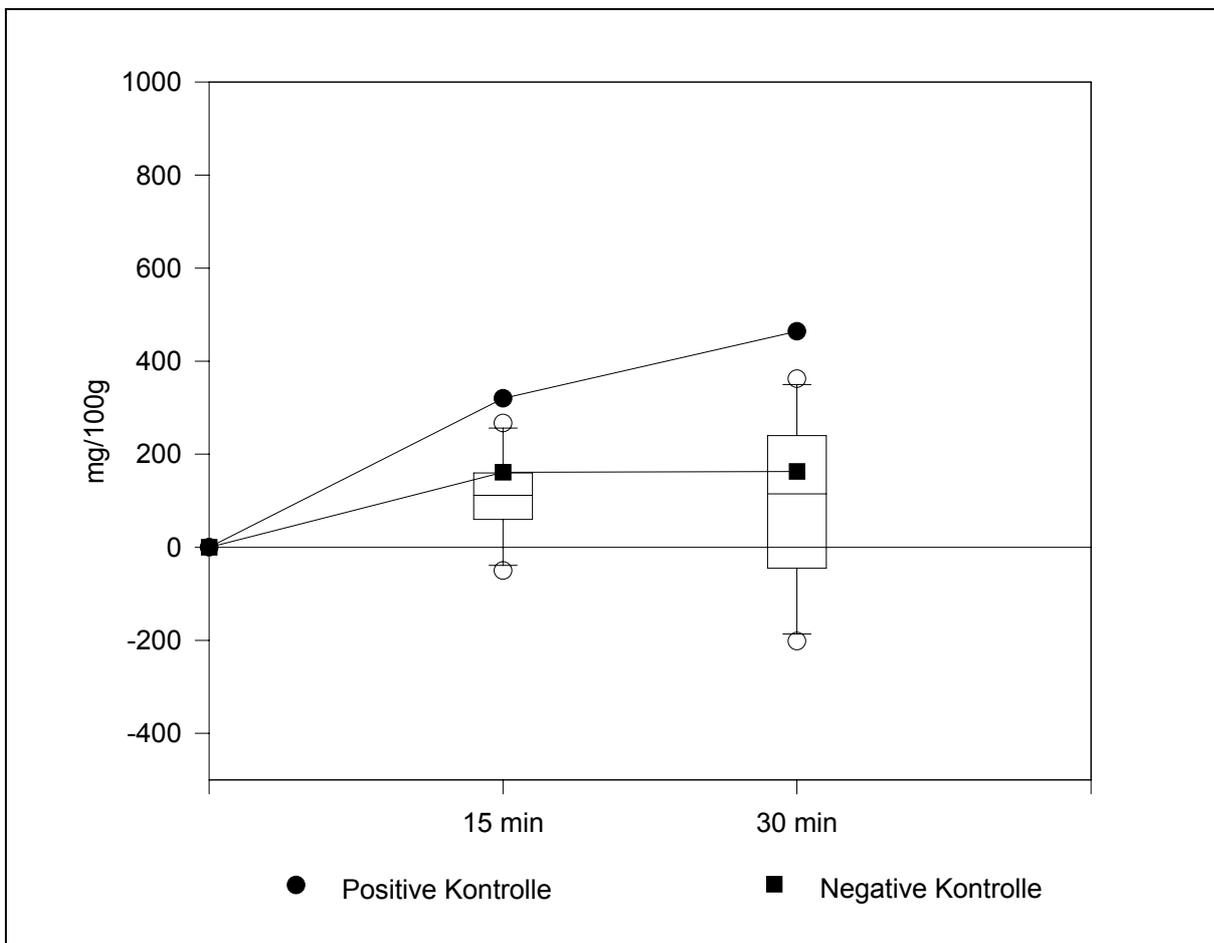
45 Minuten war er konstant bei  $4,7 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma \pm 1,73$ ). Der Mittelwert der Sauerstoffverbrauchswerte nach 75 Minuten ergab  $4,3 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma \pm 1,09$ ). Gegen Ende der Versuche sank der Wert leicht auf  $4,0 \text{ mlO}_2/\text{min}\cdot 100\text{g}$  ( $\sigma \pm 1,16$ ).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Sauerstoffverbrauch in den Gruppen 2 und 3 weitgehend konstant im physiologischen Bereich lag. In der Gruppe 1 waren die Werte aufgrund technischer Probleme nicht exakt genug zu bestimmen, lagen schätzungsweise deutlich niedriger als in den anderen beiden Gruppen.

Im statistischen Vergleich der Gruppen 2 und 3 gab es nur bei der dritten Messung nach 75 Minuten einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.9 Maltoseabsorption

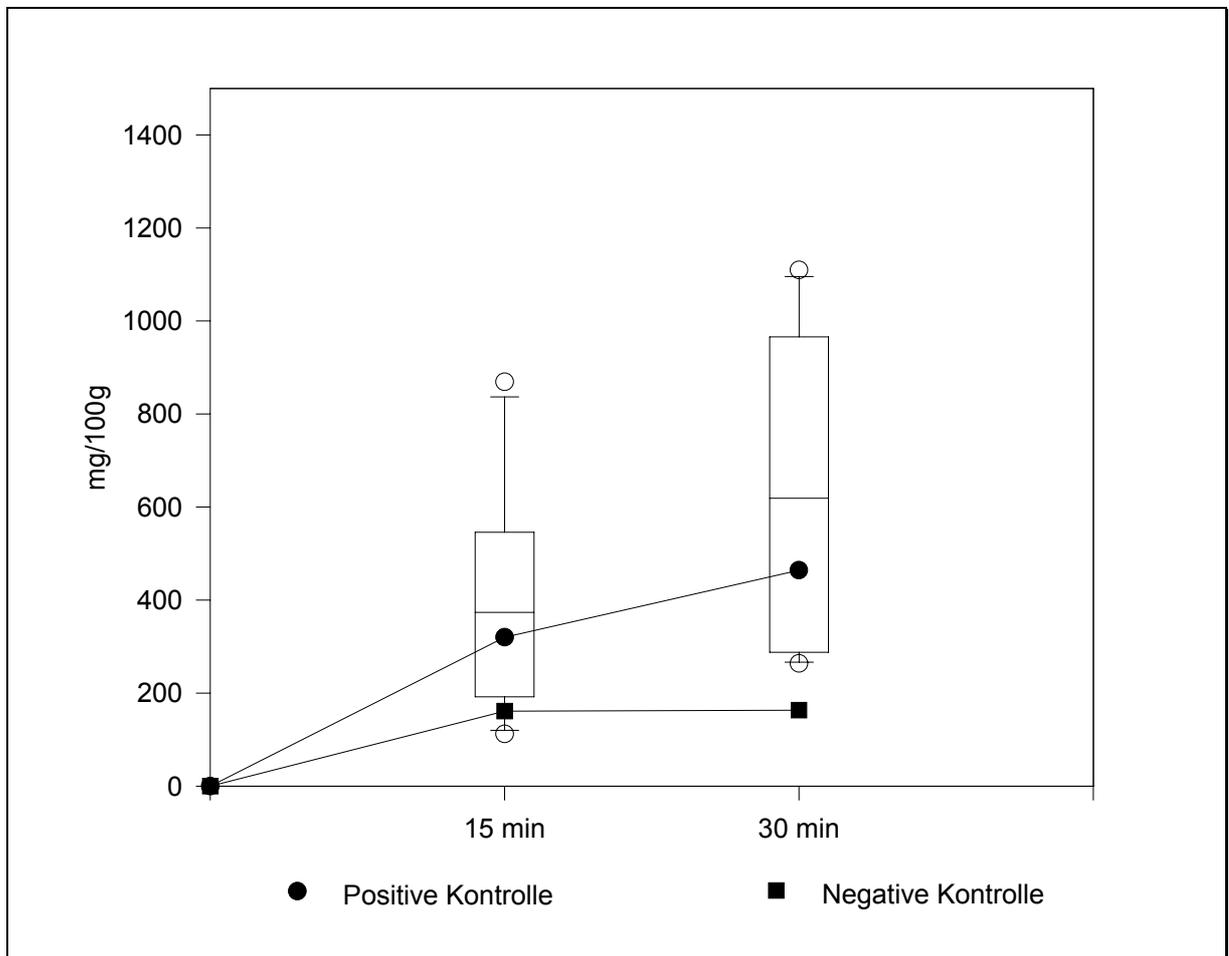
Zur Überprüfung, ob die Resorptionsfunktion des Darmes nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion erhalten gebliebenen war, führten wir regelmäßig Maltoseabsorptionstests durch. Hierfür wurde eine fest definierte Menge Maltose in das Darmlumen injiziert und anschließend der Glukoseanstieg im Perfusatblut bestimmt. Die Werte wurden auf das Perfusatvolumen und das Organgewicht berechnet und am Ende in der Einheit [mg/100g] angegeben.



**Abbildung 40: Maltoseabsorptionstest: Glukoseaufnahme nach 120 Minuten Perfusion und Instillation von 90 mg Maltose in das Darmlumen (Gruppe 1). Die Werte nach 15 und 30 Minuten liegen unterhalb der negativen Kontrolle (Darm nach 45 min. Ischämie).**

In der Gruppe 1 (Abbildung 40) kam es nach 15 Minuten zu einem leichten Anstieg der Glukose im Perfusat. Der Mittelwert betrug hier 110 mg/100g ( $\sigma \pm 106$ ). Nach weiteren 15 Minuten fiel der Wert sogar etwas ab und lag bei 98 mg/100g ( $\sigma \pm 205$ ).

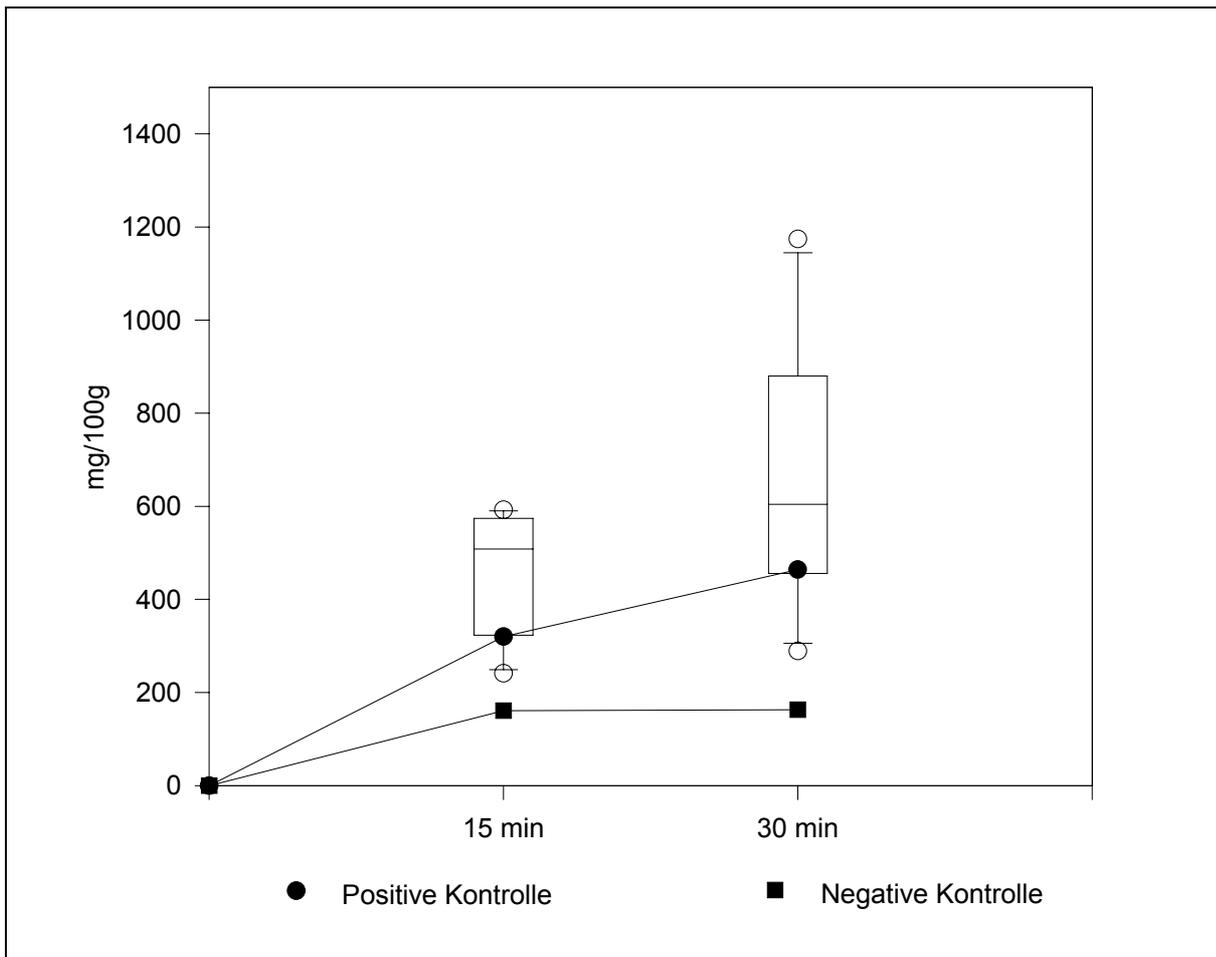
Dieses Ergebnis zeigt, dass in dieser Gruppe der Darm am Ende des Versuchs seine Vitalität und Funktionalität verloren hatte und deshalb nur sehr wenig Glukose, am ehesten durch passive Diffusion, in das Perfusatblut gelangte.



**Abbildung 41: Maltoseabsorptionstest: Glukoseaufnahme nach 120 Minuten Perfusion und Instillation von 90 mg Maltose in das Darmlumen (Gruppe 2). Die Werte nach 15 und 30 Minuten liegen im Bereich der positiven Kontrolle (in-vivo Messung).**

In den Gruppen 2 und 3 kam es im Rahmen dieses Tests zu einem deutlichen Glukoseanstieg. Die Werte lagen in diesen beiden Gruppen im gleichen Bereich, wie bei den durchgeführten In-situ-Messungen an nüchternen, narkotisierten Versuchstieren.

Der Glukoseanstieg nach 15 Minuten betrug in der Gruppe 2 (Abbildung 41) 411 mg/100g ( $\sigma \pm 272$ ). Nach 30 Minuten war der Mittelwert auf 644 mg/100g ( $\sigma \pm 345$ ) weiter angestiegen.

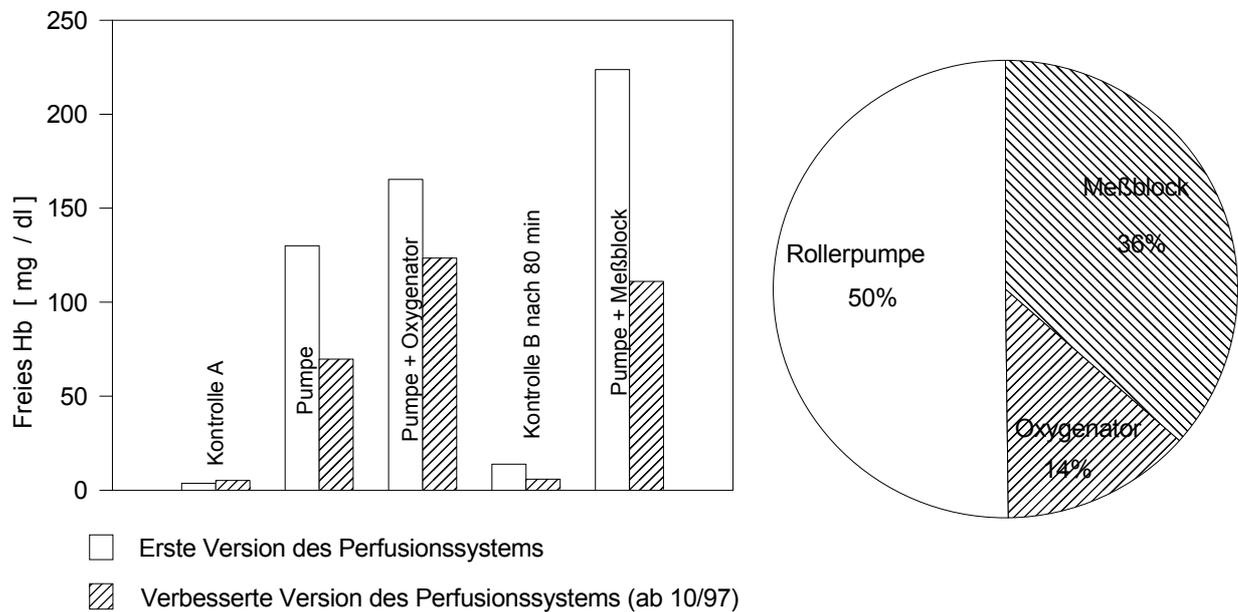


**Abbildung 42: Maltoseabsorptionstest: Glukoseaufnahme nach 120 Minuten Perfusion und Instillation von 90 mg Maltose in das Darmlumen (Gruppe 3). Die Werte nach 15 und 30 Minuten liegen oberhalb der positiven Kontrolle (in-vivo Untersuchung).**

Der Maltoseabsorptionstest ergab bei der Gruppe 3 nach 15 Minuten im Mittel einen Anstieg von 458 mg/100g ( $\sigma \pm 142$ ) und nach 30 Minuten einen weiteren Anstieg auf 668 mg/100g ( $\sigma \pm 316$ ). Der gute Glukoseanstieg im Perfusat bei den Gruppen 2 und 3, weist auf eine vitale und funktionstüchtige Dünndarmmukosa hin.

Im statistischen Vergleich zwischen den drei Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1 und der Gruppe 2 nach 15 Minuten ( $p < 0,05$ ). Die Differenz zwischen der Gruppe 1 und der Gruppe 3 war nach 15 Minuten ebenfalls signifikant ( $p < 0,01$ ). Der Unterschied der Mittelwerte zwischen der Gruppe 1 und den beiden anderen Gruppen war nach 30 Minuten als statistisch signifikant zu werten ( $p < 0,01$ ). Zwischen den Gruppen 2 und 3 gab es zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied.

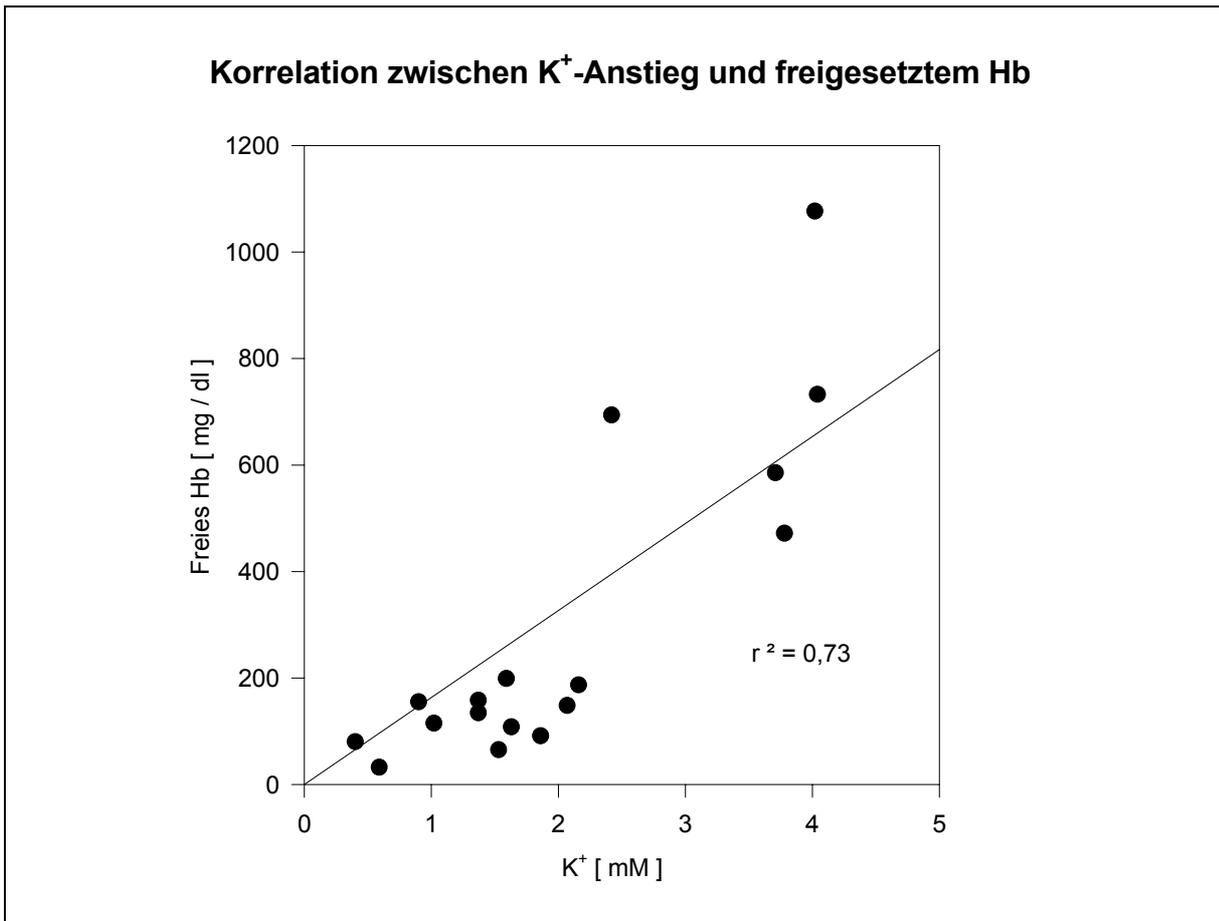
### 3.2.10 Freies Hämoglobin



**Abbildung 43: Der Anteil der einzelnen Systemkomponenten an der gesamten Hämolyse. Kontrolle A: Ausgangswert; Kontrolle B: Spontanhämolyse während der Untersuchung.**

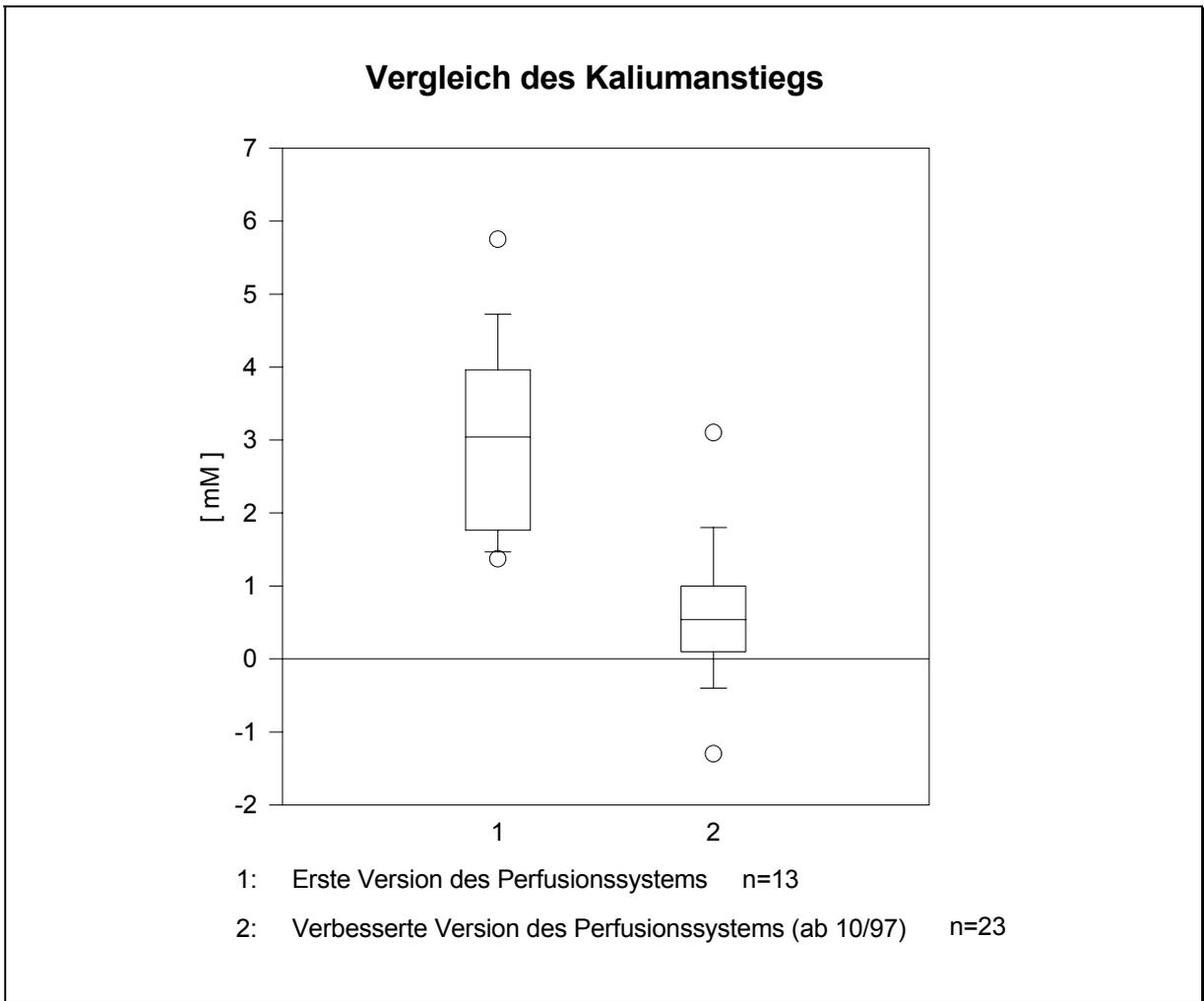
Da unsere Perfusionsflüssigkeit Erythrozyten enthielt, kam es anfangs im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation zu einer nicht unerheblichen physikalischen Hämolyse. Diese lag nach den 120 Minuten Versuchsdauer bei der ersten Version des Perfusionssystems zwischen 400 und 1100 mg/dl freiem Hämoglobins. Das entspricht einer Hämolyserate zwischen 7 und 18 % (vergl. Kap. 3.2.4 Hämatokrit). Außerdem kam es durch die Freisetzung intrazellulären Kaliums zu einem Kaliumanstieg im Plasma. Kaliumanstieg im Plasma und Anstieg des freien Hämoglobins korrelierten hierbei recht gut miteinander (Abbildung 44).

Zur Untersuchung, in welchem Abschnitt des Perfusionssystems der Hauptteil der Hämolyse verursacht wurde, haben wir die einzelnen Bestandteile des Perfusionssystems selektiv perfundiert und so den prozentualen Anteil an der gesamten Hämolyse ermittelt (Abbildung 43). Hierbei zeigte sich, dass die



**Abbildung 44: Korrelation zwischen Anstieg der Kaliumkonzentration und Anstieg von freiem Hämoglobin während 120 Minuten Perfusion. Durch die Hämolyse wird sowohl Kalium als auch Hämoglobin aus den Erythrozyten freigesetzt.**

Rollerpumpe und der Messblock die Hauptverursacher der Hämolyse waren. Es wurden daher einige Modifikationen am Perfusionssystem vorgenommen, wodurch die Hämolyse deutlich reduziert werden konnte. Sie lag jetzt nur noch zwischen 50 und 200 mg/dl. Ebenso konnte der mittlere Kaliumanstieg während der 120 Minuten ex-vivo Perfusion von 3,04 mM ( $\sigma \pm 1,36$ ) auf 0,57 mM ( $\sigma \pm 0,93$ ) reduziert werden (Abbildung 45). Der Unterschied der Mittelwerte ist statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Die in dieser Dissertation verwendeten Daten wurden alle mit dem neueren Perfusionssystem erhoben.



**Abbildung 45: Kaliumanstieg nach 120 Minuten Perfusion. Nr.1: Erste Version des Perfusionssystems mit deutlichem, hämolysebedingtem Kaliumanstieg. Nr.2: Verbesserte Version. Die Kaliumkonzentration im Perfusat bleibt weitgehend stabil.**

### 3.3 Lichtmikroskopie

Die histopathologische Auswertung der Dünndärme nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion zeigte in der Gruppe eins (Hämodilution mit NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer) eine deutliche ischämische Schädigung der Dünndarmmukosa (s. Abbildung 46). Das Interstitium der Dünndarmzotten ist stark ödematös geschwollen, die Spitzen der Villi sind fast alle schwer geschädigt und die abgestorbenen Epithelzellen haben sich teilweise in das Darmlumen abgelöst. Vielerorts sind die Villi sogar vollständig zerstört. Die Krypten sind ebenfalls geschädigt. Vor allem in den Zotten sind massenhaft gleichmäßig verteilte zelluläre Infiltrate zu erkennen. Granulozyten dominieren in diesen zellulären Infiltraten, es sind jedoch auch Lymphozyten und vereinzelt auch Makrophagen zu erkennen. In der Lamina propria und in der Muskularis sind nur wenige Entzündungszellen zu sehen. Die Subserosa ist auch leicht ödematös aufgelockert und verbreitert.

Insgesamt entspricht der Befund einer schweren ischämischen Schädigung der Dünndarmmukosa mit ausgedehnten Nekrosezonen im Bereich der Villi, aber auch der Krypten, mit höhergradiger inflammatorischer Reaktion und Infiltration durch Entzündungszellen. Aufgrund der deutlichen Schädigung der Krypten und der diffusen granulozytären Infiltration, sind die Schädigungen vielerorts als irreversibel einzustufen.

In der Gruppe zwei (Hämodilution mit Krebs-Puffer) und der Gruppe drei (Hämodilution mit Krebs-Puffer und Noradrenalin) waren die histopathologischen Ergebnisse wesentlich besser und entsprachen annähernd einem Normalbefund (s. Abbildung 47 und Abbildung 48). Zwischen den beiden Gruppen gab es kaum Unterschiede, sie können daher gemeinsam besprochen werden.

Die Struktur der Villi ist in den meisten untersuchten Arealen vollständig erhalten. Sie sind allenfalls leicht geschwollen und haben eine normale Länge, das Epithel ist überall intakt. In einigen Bereichen ist das Interstitium der Villusspitzen leicht ödematös aufgelockert. Die Enterozyten scheinen in diesen Arealen, soweit lichtmikroskopisch beurteilbar, unbeschädigt zu sein. Bei allen untersuchten Proben

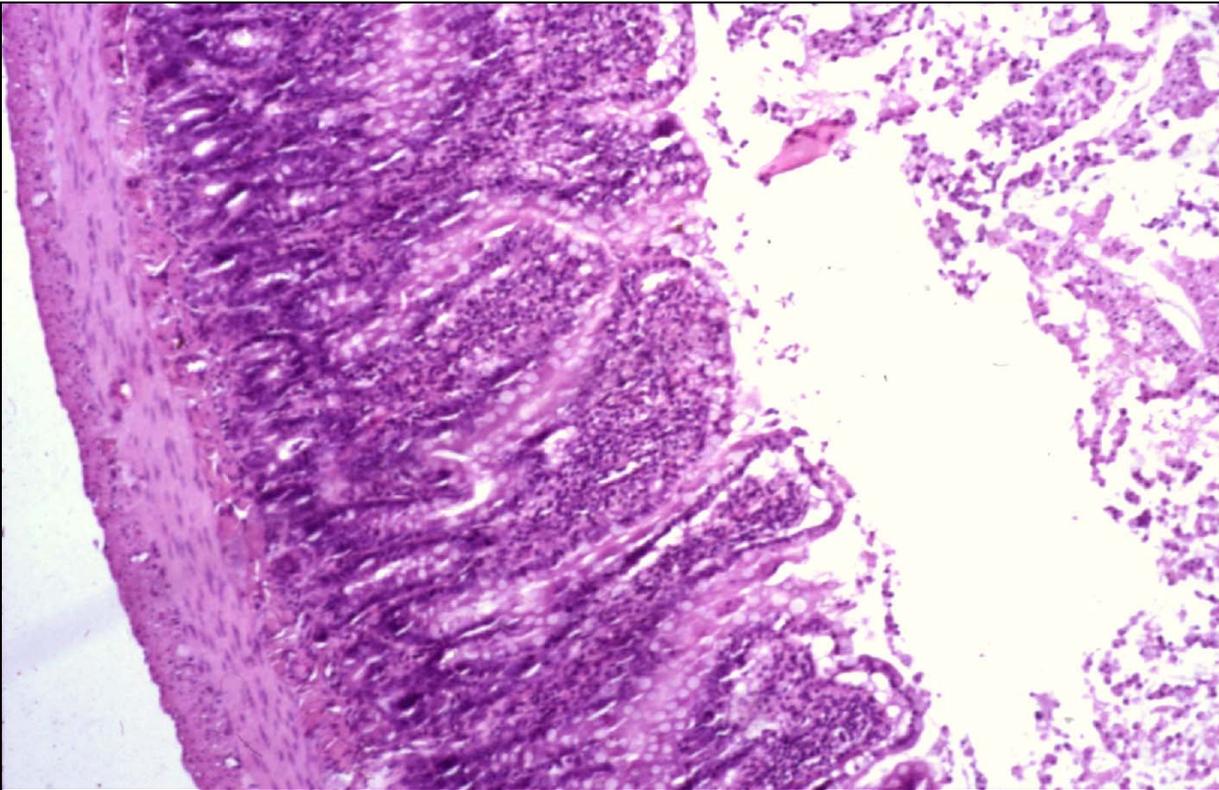
aus den Gruppen zwei und drei ist der Epithelsaum an den Villusspitzen kontinuierlich erhalten.

In der PAS-Färbung von Proben dieser beiden Versuchsgruppen, sieht man die Mikrovilli auf der luminalen Seite der Enterozyten als durchgängigen und somit vollständig erhaltenen Bürstensaum (s. Abbildung 49). Die Unversehrtheit des Bürstensaums an den Villusspitzen gilt als weiteres wichtiges Indiz, das gegen eine schwerere Schädigung der Dünndarmmukosa spricht.

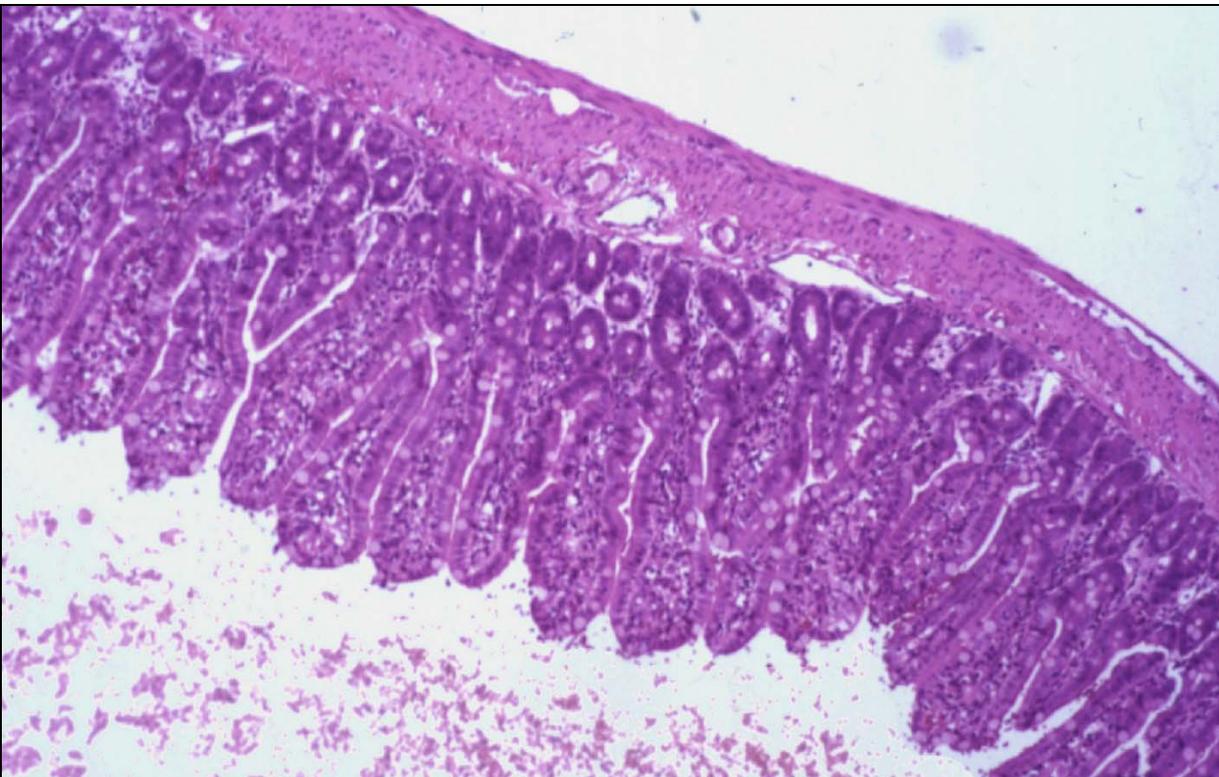
Die Krypten sind in allen Anschnitten histoarchitektonisch unauffällig. Ebenso erscheinen die Subserosa, die Muskularis und die Serosa gänzlich unauffällig.

Zusammenfassend entspricht der Befund einer allenfalls geringgradigen und somit voll reversiblen ischämischen Schädigung der Dünndarmmukosa. Das Bild der Submukosa und der weiteren Darmwandschichten entspricht einem Normalbefund.

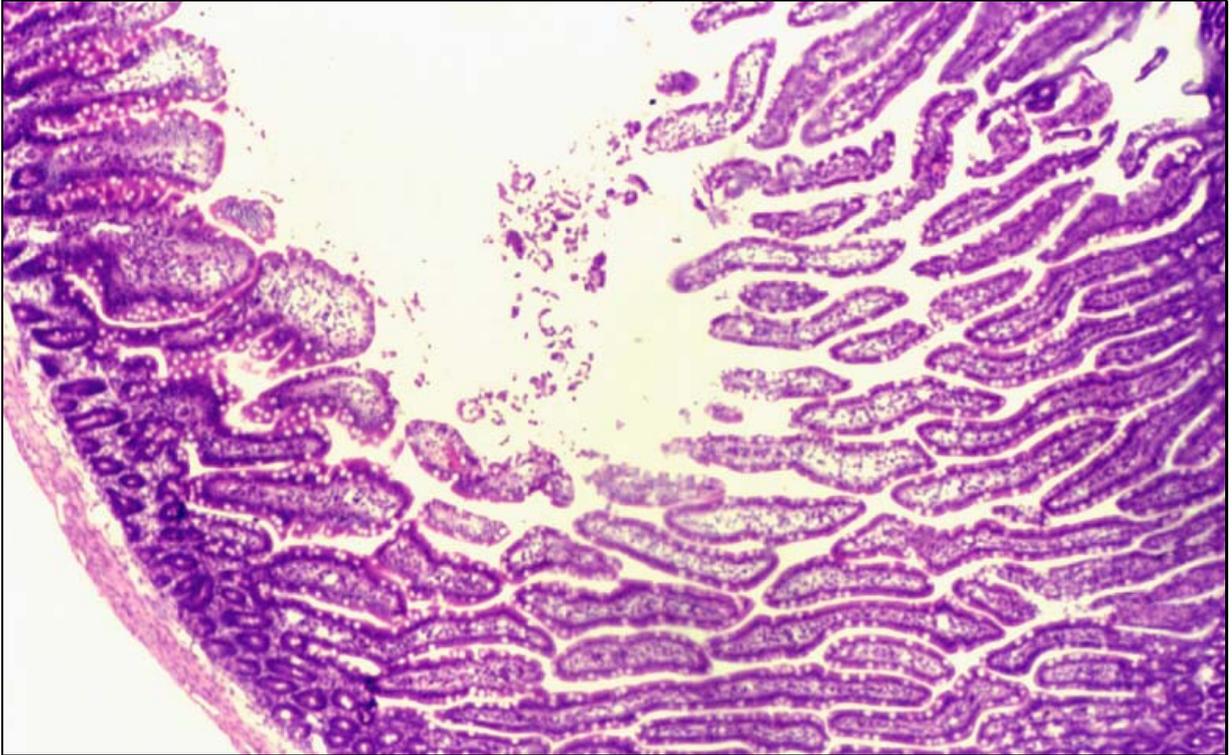
Die Abbildung 50 zeigt als positive Kontrolle einen Rattendünndarm, der einer Ratte, die als Blutspender diente, direkt post mortem entnommen wurde. Die Villi sind hier schlank und haben eine normale Länge. Vereinzelt sind Leukozyten neben den Histozyten im Interstitium zusehen. Insgesamt entspricht das Bild einem Normalbefund.



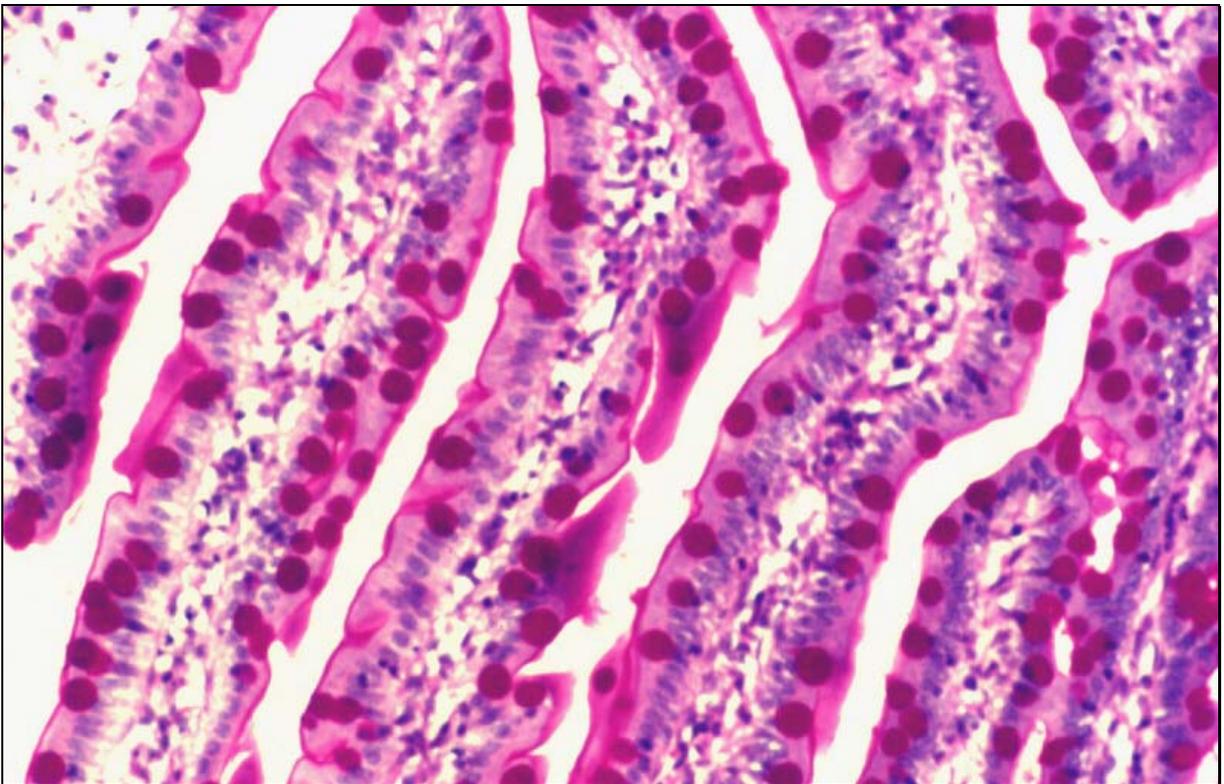
**Abbildung 46: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 1, HE, 70X): Deutliche Zerstörung aller Villi und zusätzlich schwere Schädigung der Krypten. Diffuse granulozytäre Infiltration des ödematös angeschwollenen Stomas.**



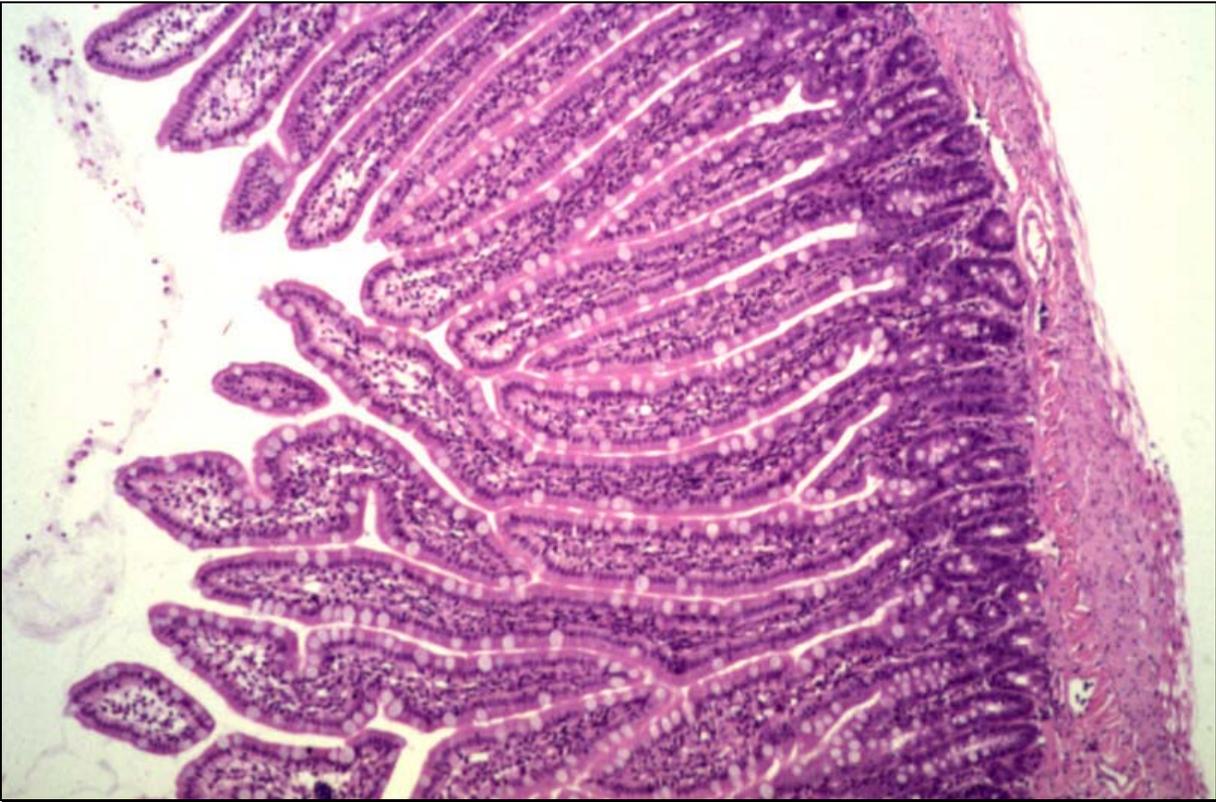
**Abbildung 47: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 2, HE, 60 X): Leichte Schwellung der Villi und geringgradige Infiltration mit Leukozyten. Epithel der Villusspitzen überall intakt.**



**Abbildung 48: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 3, HE, 40X): Regional leichte Schwellung der Villi und geringgradige Infiltration mit Leukozyten. Epithel der Villusspitzen überall intakt.**



**Abbildung 49: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 3, PAS, 200X): Becherzellen und der unbeschädigte Bürstensaum ist gut zu erkennen. Minimale Auflockerung des Bindegewebes, keine vermehrte Infiltration durch Leukozyten.**



**Abbildung 50: Positive Kontrolle (HE, 80X): Schlanke, lange Zotten, kein interstitielles Ödem, Epithel der Villusspitzen überall intakt.**

## 4 Diskussion

Trotz der Einführung neuer Immunsuppressiva haben sich die Ergebnisse bei der Dünndarmtransplantation nur wenig gebessert und sind nach wie vor deutlich schlechter als bei der Nieren- oder Lebertransplantation.

Als Ursache hierfür sind im wesentlichen vier Besonderheiten zu nennen, die bei der Transplantation des Dünndarms zu Komplikationen führen:

1. Die große Menge an lymphatischem Gewebe, das sich in den mesenterialen Lymphknoten, in den Payerschen Plaques und in der Lamina Propria des Darmes befindet und mit dem Transplantat übertragen wird. Diese spenderspezifischen Zellen sind nicht nur immunogen, sondern auch immunkompetent, was zumindest im Tiermodell bei bestimmter Spender- / Empfängerkonstellation zu einer GvHR führen kann.
2. Die große Menge an MHC Klasse II positiven dendritischen Zellen, die im Dünndarm lokalisiert sind. Diese hochspezialisierten Makrophagen sind besonders effektiv in der Aufbereitung und Präsentation von fremden Antigenen und bewirken eine starke Stimulation des Immunsystems nach Expression des Fremdmoleküls.
3. Der hohe Durchsatz von immunkompetenten Zellen in den lymphatischen Sammelstationen des Dünndarms, mit einer frühzeitigen Durchmischung von Spender- und Empfängerzellen im Transplantat. Zusätzlich wandern Spenderzellen aus dem Transplantat in das lymphatische Gewebe des Empfängers und können hier eine Immunreaktion gegen das Transplantat fördern.
4. Die natürliche intraluminale Besiedelung des Transplantats mit Mikroorganismen, die bei einer Translokation durch die Darmwand zu einer schweren Sepsis des Empfängers führt.

Wir glauben daher, dass ein wirklicher Fortschritt in der Dünndarmtransplantation nur über die Entwicklung neuer Konzepte zu realisieren sein wird. Eine Möglichkeit wäre die Vorbehandlung des Transplantats, um seine Immunogenität zu reduzieren. Es sind dabei mehrere Ansätze denkbar: Eine Vorbehandlung mit Immunsuppressiva, eine Vorbehandlung mit monoklonalen Antikörpern zur Verhinderung einer

Lymphozyten-Endothelzellinteraktion (Gruber et al [53]) oder die Vorbehandlung mit viralen Vektoren zur Expression von biologisch aktiven Substanzen direkt im Transplantat. Diese Substanzen könnten den Ischämie-Reperfusionsschaden mindern (Yamabe et al [168]) und die Funktion der Endothelzellen so verändern (Ferran et al [37]), dass somit eine Abstoßung verhindert wird (Qin et al [125]).

Die ex-vivo Dünndarmperfusion ermöglicht über eine Reihe von Versuchsansätzen die Untersuchung verschiedenster Phänomene am isolierten Dünndarm. Als Beispiele seien hier Ischämie-/Reperfusionssphänomene (Minor et al [109]), pharmakologische Resorptionsstudien (Coppen et al [27], Hanson et al [59], Schanker et al [136]), die mögliche Rolle einer lokalen Immunsuppression oder Strategien für eine Organvorbehandlung zur Reduktion der Immunogenität (Ruiz et al [132]) genannt. Von 1960 bis in die frühen 80er Jahre wurden viele Untersuchungen zur Darmphysiologie durchgeführt. Die meisten Studienprotokolle verwendeten größere Säugetiere, wie Katzen, Hunde oder Schweine (Chou et al [25], Granger et al [47], Greiner et al [51]). Im Rattenmodell wurden häufig nur In-situ-Perfusionen durchgeführt (Lucrecia et al [101]), xenogene Blutzellen (Hanson et al [60]) oder zellfreie Pufferlösungen (Jacobs et al [72]) als Perfusat verwendet, oder das Perfusatblut wurde nicht rezirkuliert (Schanker et al [114]).

Unser Ziel war es daher ein Perfusionsmodell zur Perfusion von Rattendünndärmen zu entwickeln, das die folgenden Anforderungen erfüllt:

1. Ex-vivo Perfusion
2. Rezirkulation des Perfusats
3. Normotherme Perfusion
4. Syngenes Blut als Perfusat
5. Ratten als Versuchstiere

Unser selbst entwickeltes, computergesteuertes Perfusionssystem erfüllt alle Voraussetzungen, um die oben genannten neuen Konzepte zu untersuchen:

Wir haben das ex-vivo Modell gewählt, da es bei einer späteren klinischen Anwendung

auf menschliche Organe der einzige Weg sein wird, die zu transplantierenden Organe vorzubehandeln, da eine Vorbehandlung im Organspender aus ethischen Gesichtspunkten nicht möglich sein wird.

Wir verwendeten ein rezirkulierendes Perfusionssystem, um während den 120 Minuten einen ausreichend langen Kontakt zwischen dem Transplantat und den biologisch aktiven Substanzen, die in der Zukunft in diesem System in der Perfusionsflüssigkeit eingesetzt werden könnten (virale Vektoren, monoklonale Antikörper etc.), zu erreichen. Außerdem war es uns so möglich mit äußerst geringen Mengen Rattenblut auszukommen und so Versuchstiere einzusparen.

Dadurch dass die Versuche unter normothermen Bedingungen durchgeführt wurden, konnten die biochemischen Interaktionen in einem optimalen Temperaturbereich stattfinden. Dies wäre für eine zukünftige Verwendung von viralen Vektoren von größter Wichtigkeit.

Die Verwendung des gesamten Blutes als Grundlage der Perfusionsflüssigkeit ermöglichte die Beobachtung der Leukozyten-/Endothelzellinteraktion mittels Intravitalmikroskopie (Daten wurden nicht ausgewertet). Bei der histopathologischen Untersuchung von Gewebeproben, war die massive Infiltration des Zottenstomas durch Granulozyten aus der Perfusionsflüssigkeit bei der Gruppe eins ein wichtiges Indiz für den Schweregrad der ischämischen Schädigung (Schoenberg et al [138], Levine et al [94], Swerdlow et al [156]). Für die zukünftige Anwendung in der Organvorbehandlung wäre die Entfernung der Leukozyten durch Abzentrifugieren (Entfernung des buffy coats) sicherlich zweckmäßig, da eine Aktivierung der Leukozyten durch die ex-vivo Perfusion immer stattfinden wird. Trotzdem konnten wir in den Gruppen zwei und drei keinen größeren Verlust von Leukozyten im Organ durch Sticking oder Wanderung in das Gewebe, weder laborchemisch, noch später bei der histologischen Untersuchung verzeichnen.

Das Rattenmodell wurde deshalb gewählt, da es in der Erforschung der Transplantatabstoßung das am besten untersuchte Modell ist. Es bietet weitere Vorteile in der Tierhaltung, Tierbeschaffung und es ist kostensparend.

Windmueller et al [163] beschrieb als erster ausführlich die Probleme, die bei einer Dünndarmperfusion auftreten. Ein paar Minuten nach Beginn der ex-vivo Perfusion

kam es zunächst zu einer Hypersekretion von zähflüssigem Mukus in das Darmlumen. Dieser Mukus führte später trotz offener Darmenden zu einer Aufdehnung des Darmes und letztendlich zu einer mechanischen Behinderung der Mikrozirkulation. Wir haben dieses Problem sehr ausgeprägt in der Versuchsgruppe eins, bei der das Perfusat mit NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer verdünnt wurde, gesehen. In der Versuchsgruppe zwei trat dieses Problem auch auf, allerdings in einem geringeren Ausmaß. In der Versuchsgruppe drei wurde die Hypersekretion durch die kontinuierliche Beimischung von Noradrenalin in das Perfusat weitgehend unterdrückt.

Als zweites Problem wurde eine Hypermotilität des Darmes beschrieben, die von manchen Autoren (Dubois et al [33]) als Zeichen einer ungenügenden Oxygenierung des Organs angesehen wurde. In den Gruppen zwei und drei trat in unseren Experimenten keine verstärkte Motilität auf. In der Gruppe eins trat kurz nach Beginn der Perfusion Hypermotilität als eindeutiges Zeichen einer Darmischämie auf.

Als Drittes wurde von Windmueller am Anfang eine Hyperämie mit niedrigem Gefäßwiderstand und hohen Flussraten beschrieben, die nach einer gewissen Zeit in eine allgemeine Vasokonstriktion mit daraus folgendem hohem Gefäßwiderstand und Abnahme der Flussrate überging. In seinen Experimenten konnte er dieses Problem durch die Zugabe von Noradrenalin und Dexamethason zum Perfusat lösen (Windmueller et al [165]). Ebenso beschrieb er die Zugabe von Atropin als nützlich. Wir haben den Zusatz von Atropin in unseren Versuchen getestet, konnten jedoch keinen Effekt auf die Hypersekretion oder auf den niedrigen Gefäßwiderstand verzeichnen.

Auf Dexamethason als medikamentöser Zusatz zum Perfusat wollten wir verzichten, da unser Versuchsaufbau später auch zur Untersuchung der Leukozyten-Endothelinteraktion dienen sollte. Diese Interaktionen wären durch den Zusatz von Dexamethason nachhaltig beeinflusst worden. Abgesehen davon gelang es uns auch ohne den Zusatz von Dexamethason, nämlich nur durch die Zugabe von Noradrenalin, die Perfusionsflussrate im physiologischen Bereich zu halten.

Im Gegensatz zu den meisten bis heute beschriebenen Versuchsprotokollen, verwendeten wir syngenes Vollblut, das auf einen Hämatokrit von 30% mit Krebspuffer verdünnt wurde. Andere Perfusionslösungen, wie Lösungen von xenogenen Erythrozyten (Braun et al [34]) und Pufferlösungen, mit oder ohne

künstlichen Sauerstoffträgern (Hartmann et al [63]), sind leichter herzustellen, aber erlauben nicht die Untersuchung von Ischämie-Reperfusionssphänomenen und sind für eine Organvorbehandlung ungünstig. Die Verwendung von syngem Vollblut war unseres Erachtens die physiologischste Variante mit den wenigsten Nebenwirkungen auf das Organ. Die Zugabe von Noradrenalin alleine zum mit Krebspuffer hämodilutierten Vollblut war ausreichend, um alle Probleme, die im Zusammenhang mit der ex-vivo Dünndarmperfusion in der Literatur beschrieben worden sind, zu unterdrücken (Windmueller et al [164,163,165]). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch die zwangsläufige Denervierung des Darms der sympathische, noradrenerge Dauertonus entfällt. Dadurch kommt es zu einer Vasodilatation und durch das Überwiegen der intrinsischen parasymphatischen Aktivität des Dünndarms zur vermehrten Schleimbildung und zu einer verstärkten Motilität.

Ein weiteres Problem das anfänglich bestand, waren die physikalische Hämolyse und der Abfall Hämatokritwertes über die 120 Minuten Perfusion, durch hämodynamisch ungünstig geformte Bestandteile des Systems. Faktoren, die zu einer Hämokonzentration und damit dem Hämatokritabfall entgegen wirkten, wie zum Beispiel die Verdunstung von freiem Wasser oder der Verlust von freier Flüssigkeit in das Darmlumen, waren vernachlässigbar klein. Das lässt sich an den relativ konstanten Natrium- und Kaliumwerten und der gleichbleibenden Osmolarität erkennen. Ebenso war das Gesamtvolumen des Perfusats am Beginn und am Ende der Versuche annähernd gleich. Der sensibelste Parameter zur Bestimmung der Hämolyse ist sicherlich die Untersuchung des freien Hämoglobins. Die ersten gemessenen Werte waren sehr hoch und veranlassten uns zu einer Modifikation des Perfusionssystems. Die Werte lagen danach in einem Bereich, der uns für die Dünndarmperfusion als unbedenklich erschien.

Entscheidend für den Nutzen einer ex-vivo Perfusion zur Organvorbehandlung ist, dass das Organ durch diese Prozedur primär keinen Schaden nimmt. Wäre dies der Fall, so würde die Vorbehandlung keinen Vorteil zur direkten Transplantation bieten. Der günstigste Weg die Vitalität des Darms nach einer zweistündigen ex-vivo Perfusion zu belegen, wäre sicherlich die anschließende syngene und orthotope Transplantation gewesen (Harmel [62]). Dies hätte jedoch zu einer enormen Erweiterung des

Versuchsprotokolls geführt und war deshalb nicht praktikabel.

Deshalb haben wir uns entschlossen, die Vitalität und Funktionalität des Organs während der Perfusion durch verschiedene Messungen zu beweisen:

1. Glukoseverbrauch und Laktatanstieg
2. Sauerstoffverbrauch
3. Maltoseabsorption

Das bevorzugte Nährsubstrat des Dünndarms ist Glutamin. Glutamin ist eine nichtessentielle, neutrale Aminosäure, die in fast allen Geweben des Körpers gebildet wird und die größte Fraktion der freien Aminosäuren im Plasma darstellt. Der komplette oxidative Abbau erfolgt über Glutamat und  $\alpha$ -Ketoglutarat im Krebs-Zyklus. Für die Enterozyten in der Dünndarmmukosa ist Glutamat, besonders in kritischen Situationen mit kataboler Stoffwechsellage, wie nach Trauma, Verbrennungen, größeren Operationen und bei Sepsis, das bevorzugte Nährsubstrat (Windmüller et al [166,167]). Ein protektiver Effekt auf die Mukosa durch erhöhte Glutamin-Konzentrationen im Plasma sowie ein erhöhter Verbrauch durch die Mukosa nach Operationen und bei Sepsis, konnten tierexperimentell nachgewiesen werden (Frankel et al [42], Lew et al [96], Noguchi et al [113], Souba et al [147,80,79]). Ein Ansteigen des Ammoniakspiegels durch die Metabolisierung von Glutamin nach Dünndarmtransplantation mit portocavaler Anastomose konnte nicht festgestellt werden (Koltun et al [82]). Glutamin wurde während der Explantation intraluminal verabreicht, um den Enterozyten zur Zeit der Explantation und am Beginn der Perfusion ausreichend Nährsubstrat anzubieten. Da der Glutaminverbrauch laborchemisch schwieriger zu messen ist als der Glukoseverbrauch, wurde kein weiteres Glutamin mehr ersetzt. Die Enterozyten haben sich daraufhin auf den Verbrauch von Glukose umgestellt. In den Gruppen zwei und drei nahm die Glukosekonzentration im Perfusatblut in den 120 Minuten des Versuchs kontinuierlich ab. Das bedeutet, dass in diesen beiden Gruppen während des gesamten Versuchs Glukose durch den Darm verbraucht wurde. Der gemessene Glukoseverbrauch stellt den Mindestverbrauch dar, da noch Restglukose von der intraoperativen Spülung des Darmlumens während der ex-vivo Perfusion aus

dem Lumen resorbiert wurde. Der Glukoseverbrauch war in den zweiten 60 Minuten genauso hoch wie in den ersten 60 Minuten des Versuchs. Daher kann man behaupten, dass durch die ersten 60 Minuten ex-vivo Perfusion die Fähigkeit des Darms Glukose als Nährsubstrat zu metabolisieren, nicht gemindert wurde. Die Menge der verbrauchten Glukose stimmte mit anderen Untersuchungen am isolierten Rattendünndarm sehr gut überein (Kavin et al [78], Hutchinson et al [69,67], Hanson et al [59], Windmueller et al [163]).

In der Gruppe eins hingegen war der Glukoseverbrauch von Anfang an nur etwa halb so hoch wie in den anderen beiden Gruppen. In den zweiten 60 Minuten der Perfusion war dann kaum mehr ein Glukoseverbrauch zu messen. Gleichzeitig kam es zu einem deutlich höheren Laktatanstieg als in den beiden anderen Gruppen. Aus dem direkten Vergleich zwischen Glukoseverbrauch und Laktatanstieg wird deutlich, dass in den Gruppen zwei und drei die Glukose vornehmlich aerob verstoffwechselt wurde. In der Gruppe eins war der Laktatanstieg etwa doppelt so hoch wie der Glukoseverbrauch. Die Energiegewinnung aus Glukose erfolgte in dieser Gruppe fast ausschließlich durch anaerobe Glykolyse.

Bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs berücksichtigten wir sowohl den Verbrauch des hämoglobingebundenen Sauerstoffs, als auch den Verbrauch des physikalisch gelösten Sauerstoffs. Dies war notwendig, da die Sauerstoffpartialdrücke im arteriellen Blut in allen Gruppen zwischen 150 und 200 mmHg lagen und der Anteil des physikalisch gelösten Sauerstoffs so etwa 24 % am Gesamtsauerstoffverbrauch ausmachte. In der Gruppe eins konnte aufgrund der niedrigen Flussraten kein Sauerstoffverbrauch berechnet werden. Der Sauerstoffverbrauch in den Gruppen zwei und drei unterlag zwar starken Schwankungen, er war aber insgesamt ausreichend hoch, so dass hiermit die Vitalität in diesen beiden Gruppen bewiesen werden konnte. Die gemessenen Werte in diesen beiden Gruppen stimmen gut mit den Angaben aus der Literatur (Minor et al [109], in situ: Lucrecia et al [101]) überein.

Als Absorptionstest wählten wir den Maltoseabsorptionstest, da bei diesem Test zusätzlich zur energieabhängigen Resorption, die vorherige Spaltung von Maltose in

zwei Moleküle Glukose erforderlich ist. Die Spaltung von Maltose geschieht durch das Bürstensaumenzym Maltase. Bei einer Beschädigung der Bürstensaumenzyme wird keine Maltose resorbiert, da es für ungespaltene Maltose keine Resorptionsmöglichkeit gibt. Aus Voruntersuchungen (Eloy et al [34]) weiß man, dass ein intakter Bürstensaum ein wichtiges Kriterium für die Vitalität des Organs ist. Bei diesem Test wird daher die Funktionstüchtigkeit des Bürstensaumenzym Maltase und der energieabhängigen Glukosetransporter überprüft.

Der Anstieg der Glukosekonzentration im Perfusatblut wurde 15 und 30 Minuten nach der intraluminalen Verabreichung von 90 mg Maltose gemessen. Die von uns erhaltenen Werte in den Gruppen zwei und drei waren mit den Ergebnissen aus in-situ Messungen von Billiar et al [13] vergleichbar.

Zusätzlich bietet die histopathologische Untersuchung der Dünndärme nach der zweistündigen ex-vivo Perfusion weitere wichtige Informationen über morphologische Schäden an dem Organ. Die Gewebeproben wurden an zwei unterschiedlichen Stellen entnommen. In der Gruppe eins wurden bei 7 Versuchen Proben entnommen, in den Gruppen zwei und drei bei jeweils 6 Versuchen. Zusammen stellten somit 38 Stichproben eine ausreichende Anzahl dar, um eine verlässliche Aussage über den Zustand der Dünndärme in den einzelnen Gruppen zu machen. Die Proben wurden von einem unabhängigen Untersucher ausgewertet, der keine Kenntnis davon hatte, aus welcher Gruppe das jeweilige Präparat stammte.

Das histologische Korrelat des Dünndarms nach ischämischer Schädigung ist weitestgehend definiert (Chiu et al [24], Haglund et al [3,119], Crissinger et al [28], Quaedackers et al [126], Swerdlow et al [156], Illyes et al [70], Schoenberg et al [138]): Bei einer leichten ischämischen Schädigung kommt es zunächst zu einer ödematösen Schwellung des Bindegewebes und zu einer Verbreiterung des subepithelialen Raumes, jeweils an den Villusspitzen. Die mittelschwere ischämische Schädigung ist durch eine weitere Abhebung des Epithels bis unterhalb der Villusspitzen charakterisiert. An den Villusspitzen kommt eine beginnende Ablösung des Epithels in das Darmlumen hinzu. Das Stoma wird durch Neutrophile Granulozyten infiltriert. Die schwere ischämische Schädigung des Darmes zeichnet sich dadurch aus, dass sich die Epithelzellen mehr und

mehr in Richtung der Krypten ablösen, bis die Villi schließlich vollkommen denudiert sind. Die Zytoarchitektur der Villi wird vollständig zerstört, es kommt zur Ulzeration, Hämorrhagie und zu einer massiven Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Die denudierten Villi erscheinen plump und verkürzt. Die Krypten sowie die darunterliegenden Strukturen (Submukosa, Muskularis, Serosa) bleiben auch bei einer schweren ischämischen Schädigung des Darmes intakt.

Die Ursache für den Beginn der morphologisch sichtbaren Schädigung an den Villusspitzen liegt an der Blutversorgung der Dünndarmzotten (Chiu et al [24]). Jede Zotte wird von einer zentral verlaufenden Arteriole versorgt, die im Verlauf bis an die Spitze kontinuierlich und zentrifugal Kapillaren in die Endstrombahn abgibt. Diese sammeln sich anschließend wieder zu einem venösen Netzwerk, welches subepithelial verläuft. So kommt es bei einer kritisch niedrigen Blutversorgung zu einem Phänomen der "Letzten Wiese" an den Villusspitzen.

In unseren Versuchen konnten wir bei der Verwendung von NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer als Hämodilutionslösung (Gruppe eins) bei der histopathologischen Auswertung eine schwere ischämische Schädigung der Mukosa und teilweise sogar eine Schädigung von tiefer liegenden Wandstrukturen nachweisen. Dieser Befund deckt sich sehr gut mit den Erkenntnissen, die während der Versuche anhand der durchgeführten physiologischen Untersuchungen gewonnen wurden.

In den beiden anderen Gruppen waren die histologischen Befunde deutlich besser. Hier waren nur fokale leichte Schäden an den Villusspitzen zu sehen.

Allgemein gelten auch schwere ischämische Schäden an der Dünndarmmukosa bei erhaltenen Krypten als reversibel (Illyes et al [70], Quaedackers et al [126], Park et al [119]). Unter dem Gesichtspunkt einer zukünftigen Nutzung des Perfusionssystems zur Organvorbehandlung, konnten allenfalls geringe ischämische Schäden akzeptiert werden. Dies bedeutet, dass nur die Versuchsprotokolle der Gruppen zwei und drei Verwendung finden könnten.

Letztendlich ist der gravierende Unterschied in den Ergebnissen zwischen der Gruppe eins und den Gruppen zwei bzw. drei, die sich im wesentlichen nur durch verschiedene Hämodilutionslösungen unterscheiden, zu erörtern. Bei der Verwendung von

NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer als Hämodilutionslösung (Gruppe eins) kam es nach ca. 15 Minuten zu einem massiven Flussabfall, mit nachfolgender ischämischer Schädigung des Darmes. Die durchgeführten Tests (Glukoseverbrauch, Maltoseabsorption) zeigten die Funktionsuntüchtigkeit des Organs an, auch die anschließende histologisch Untersuchung bestätigte schwerste ischämische Schäden. Die Ursache hierfür muss logischerweise eine früh einsetzende Behinderung der Blutversorgung des Organs sein. Diese kann entweder durch eine mechanische Verlegung der Strombahn durch Thromben oder Emboli, eine extreme Vasokonstriktion oder durch arterio-venöse Shunts entstehen. Anhalt für Thrombenbildung gab es histologisch in keiner Gruppe, da das Perfusatblut immer vollheparinisiert war. Ebenso konnten keine kristallinen Ausfällungen in den Hämodilutionslösungen beobachtet werden. Bakterielle Kontamination der Hämodilutionslösungen wurde durch regelmäßiges Neuanfertigen, Kühlung der fertigen Lösung und die Verwendung von Bakterienmikrofiltern vermieden.

Bei dem Vergleich der beiden Hämodilutionslösungen fällt auf, dass der Krebs-Puffer (Gruppe zwei und drei) zusätzlich Eiweiß als onkotisch wirksamen Zusatz enthält. Außerdem ist die Abstimmung der Elektrolyte besser an das Blutserum angepasst. Der Krebs-Puffer enthielt Kalzium, Magnesium, Kalium, Phosphat und Sulfat in physiologischer Konzentration.

In der Gruppe eins wurden alle Blutbestandteile außer Kochsalz und Bikarbonat im Verhältnis 2:1 verdünnt. Das Serumeiweiß (6g/dl) wurde so durch Verdünnung mit der rein kristalloiden Lösung auf 4g/dl reduziert, ebenso die Elektrolyte. Wir vermuten daher, dass die Ursache für die Behinderung der Blutversorgung des Darmes in der Gruppe eins eine Kombination aus interstitiellem Ödem aufgrund eines erniedrigten onkotischen Drucks und einer gestörten Vasomotorik aufgrund einer Elektrolytstörung im Perfusat, im Sinne einer Hypernatriämie, Hypokaliämie, Hypokalzämie, gewesen zu sein scheint.

Das von uns in der Gruppe drei verwendete Noradrenalin wird von vielen Autoren kritisch gesehen (Majno et al [104], Levine et al [94]). Es führt in höherer Dosierung zu einer Vasokonstriktion in der Mukosa und damit zu einer Umverteilung der Durchblutung hin zur Muskularis. Zusätzlich ist eine Zunahme des Shuntvolumens in

den Villi beschrieben (Levine et al [94]).

Wir verzeichneten jedoch in unseren Versuchen ohne die Zugabe von Noradrenalin (Gruppe zwei) ein Überwiegen der intrinsischen parasympathischen Aktivität mit vermehrter Mukussekretion in das Darmlumen und einer gestörten Gefäßtonisierung. Die Ursache hierfür ist die zentrale Denervierung des Organs mit aufgehobener Sympathikusaktivität. Diese normal vorhandene Daueraktivität besitzt einen hemmenden Einfluss auf die intrinsische parasympathische Aktivität und auf die Freisetzung anderer vasodilatatorisch wirkender Mediatoren wie VIP oder Substanz P. Unterstützt wird diese These dadurch, dass bei In-situ-Modellen (Lucrecia et al [101]) zur Darmperfusion bei gleichen arteriellen Drücken immer ein geringerer Blutfluss zu verzeichnen ist, als bei ex-vivo Modellen.

Wir haben daher in der Gruppe 3 Noradrenalin kontinuierlich, in geringsten Mengen substituiert und so die fehlende Sympathikusaktivität ersetzt und alle unerwünschten Folgen der Denervierung behoben.

## 5 Schlussfolgerung

- **Schlussfolgerung zu Punkt 1 der Fragestellung** (Ist eine zweistündige normotherme ex-vivo Perfusion des isolierten Dünndarms mit dem selbst entwickelten, computergesteuerten Perfusionssystem möglich, ohne dass der Darm histologisch erkennbaren Schaden nimmt?) :

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass ein Rattendarm über 120 Minuten mit dem selbst-entwickelten Perfusionssystem ex-vivo perfundiert werden kann, ohne dass er histologisch erkennbaren Schaden nimmt. Die histopathologischen Auswertungen von Versuchsmaterial der Gruppen 2 und 3 in HE- und PAS-Färbungen ergaben eine allenfalls geringgradige und damit voll reversible ischämische Schädigung der Dünndarmmukosa.

Die histologischen Untersuchungen der Gruppe 1 wiesen schwere ischämische Schädigungen auf.

- **Schlussfolgerung zu Punkt 2 der Fragestellung** (Lässt sich die Vitalität des Organs auch während des Versuchs, über die Messung verschiedener physiologischer Parameter und spezielle Funktionstests nachweisen?) :

Zur Objektivierung der Vitalität der Organe wurden während der ex-vivo Perfusion der Glukoseverbrauch, der Sauerstoffverbrauch und die Fähigkeit Maltose zu absorbieren untersucht.

Der Glukoseverbrauch war in den Gruppen 2 und 3 ausreichend hoch und lag in einem ähnlichen Bereich wie aus in-vivo Untersuchungen bekannt. Gleichzeitig kam es hier nur zu einem geringen Laktatanstieg, was auf einen geringen Anteil anaeroben Stoffwechsels schließen lässt. In der Gruppe 1 war der Glukoseverbrauch weitaus geringer. Dagegen war die Laktatproduktion verhältnismäßig höher, was auf einen hypoxisch-ischämischen Glukosestoffwechsel schließen lässt.

Der Sauerstoffverbrauch lag in den Gruppen 2 und 3 zu allen Messzeitpunkten in einem physiologischen Bereich. In der Gruppe 1 war die Bestimmung des

Sauerstoffverbrauchs aufgrund technischer Probleme nicht möglich.

Am Ende des Versuchs wurde jeweils ein Maltoseabsorptionstest durchgeführt. Die gemessenen Werte nach 15 und 30 Minuten waren in den Gruppen 2 und 3 höher als in der negativen Kontrolle und bewiesen die Fähigkeit des Darms über einen letztendlich energieabhängigen Prozess Glukose zu absorbieren.

- **Schlussfolgerung zu Punkt 3 der Fragestellung** (Welche der getesteten Hämodilutionslösungen und medikamentösen Zusätze ergeben die besten Resultate?) :

Es wurden drei verschiedene Versuchsprotokolle getestet: Gruppe 1 (NaHCO<sub>3</sub>-Puffer als Hämodilutionslösung), Gruppe 2 (Krebspuffer als Hämodilutionslösung) und Gruppe 3 (Krebspuffer als Hämodilutionslösung und kontinuierliche Zugabe von Noradrenalin während der Perfusion)

Die Versuchsergebnisse in der Gruppe 1 waren allesamt unbefriedigend. Die Verwendung von NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer als Hämodilutionslösung hat sich als nicht praktikabel erwiesen.

In den Versuchsgruppen 2 und 3 waren die Ergebnisse bedeutend besser. Die Messung der physiologischen Parameter und die Funktionstests ergaben annähernd physiologische Werte. Ebenso zeigten die histologischen Untersuchungen nur minimale Schädigungen.

In der Gruppe 3 wurde durch den Zusatz von Noradrenalin zum Perfusatblut die in den anderen Gruppen regelmäßig auftretenden Phänomene Hyperämie, Hypersekretion und Hypermotilität erfolgreich unterdrückt.

Nach unserer Ansicht erfüllt das Versuchsprotokoll der Gruppe 3 die Anforderungen für eine ex-vivo Darmperfusion zur Vorbehandlung vor einer Transplantation am besten und sollte daher verwendet werden.

## 6 Zusammenfassung

Die allogene Transplantation des Dünndarms ist wegen der hohen Immunogenität des Organs problematisch. Da die Immunsuppression des Empfängers alleine keine befriedigenden Ergebnisse liefert, stellt sich die Frage, ob eine ex-vivo Vorbehandlung des Organs zur Reduktion der Immunogenität Vorteile bietet.

Für dieses Vorhaben wurde ein computergesteuertes ex-vivo Perfusionssystem entwickelt, das eine mehrstündige, normotherme Perfusion mit erythrozytenhaltigen Perfusionslösungen erlaubt. Bevor Vorbehandlungsprotokolle zum Einsatz kommen können, müsste untersucht werden, ob das Transplantat durch die mehrstündige ex-vivo Perfusion selbst geschädigt wird.

Die vorliegende Dissertation zeigt, dass eine zweistündige, normotherme ex-vivo Perfusion eines Dünndarmsegments der Ratte mit unserem selbstentwickelten Perfusionssystem möglich war, ohne dass das Organ erkennbaren Schaden nahm.

Von den getesteten Hämodilutionslösungen erwies sich der Krebspuffer und die kontinuierliche Substitution von Noradrenalin, durch die Unterdrückung von Hyperämie und Hypersekretion, als am günstigsten (Gruppe 3). Bei der Verwendung von Krebspuffer alleine als Hämodilutionslösung kam es zu einer nachteiligen Hyperämie und Hypersekretion (Gruppe 2). NaCl/HCO<sub>3</sub>-Puffer als Hämodilutionslösung zeigte sich als in jeder Hinsicht unbrauchbar (Gruppe 1).

Mittels verschiedener metabolischer Studien und Funktionstests konnte in den Gruppen zwei und drei die Vitalität des Organs während des Versuchs bewiesen werden. Ebenso konnte die strukturelle Integrität des Darms am Ende der Versuche durch histopathologische Untersuchungen belegt werden.

Das Versuchsprotokoll der Gruppe 3 ermöglicht die zweistündige ex-vivo Perfusion von Dünndarmtransplantaten, ohne dass das Organ dadurch nennenswert geschädigt wird und kann somit für verschiedenste Vorbehandlungskonzepte genutzt werden.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Dünndarmsegment während ex-vivo Perfusion (1) .....	3
Abbildung 2: Überlebensraten von Patienten unter totaler parenteraler Ernährung (TPN).....	8
Abbildung 3: Patient- und Transplantatüberlebensraten nach DDTx .....	9
Abbildung 4: ICONview-Window .....	21
Abbildung 5: Realtime VISION-Window.....	22
Abbildung 6: Querschnitt durch den Oxygenator .....	24
Abbildung 7: Aufbau des Perfusionssystems in einer Schemazeichnung.....	27
Abbildung 8: Querschnitt durch die Plexiglaseinheit.....	29
Abbildung 9: Versuchsaufbau .....	30
Abbildung 10: Versuchsablauf der ex-vivo Dünndarmperfusion in einer Schemazeichnung.....	46
Abbildung 11: Strukturformel von Maltose (O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ - D-Glucopyranose).....	55
Abbildung 12: Dünndarmsegment während der ex-vivo Perfusion (2) .....	58
Abbildung 13: Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1).....	60
Abbildung 14: Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2).....	61
Abbildung 15: Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3).....	62
Abbildung 16: Mittelwerte der Flussraten während 120 Minuten Perfusion (Alle drei Gruppen im Vergleich).....	63
Abbildung 17: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1) .....	64
Abbildung 18: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2) .....	65
Abbildung 19: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3).....	66
Abbildung 20: Arterieller Mitteldruck (MAP) während 120 Minuten Perfusion (Alle drei Gruppen im Vergleich).....	67
Abbildung 21: Arterieller Sauerstoffpartialdruck während 120 Minuten	

Perfusion (Gruppe 1).....	69
Abbildung 22: Arterieller Sauerstoffpartialdruck während 120 Minuten	
Perfusion (Gruppe 2).....	70
Abbildung 23: Arterieller Sauerstoffpartialdruck während 120 Minuten	
Perfusion (Gruppe 3).....	71
Abbildung 24: Vergleich der Mittelwerte der arteriellen Sauerstoff-	
partialdrücke der drei Versuchsgruppen während 120 Minuten ex-vivo	
Perfusion. ....	72
Abbildung 25: pH-Wert während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 1).....	74
Abbildung 26: pH-Wert während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 2).....	75
Abbildung 27: pH-Wert während 120 Minuten Perfusion (Gruppe 3).....	76
Abbildung 28: Vergleich der Mittelwerte der pH-Werte der drei	
Versuchsgruppen während 120 Minuten ex-vivo Perfusion .....	77
Abbildung 29: Temperatur des Wasserbeckens während 120 Minuten	
Perfusion (Alle drei Gruppen). ....	78
Abbildung 30: Glukoseverbrauch pro Minute durch das Organ während der	
ex-vivo Perfusion.....	79
Abbildung 31: Laktatproduktion pro Minute durch das Darmsegment	
während der ex-vivo Perfusion.....	81
Abbildung 32: Verstoffwechslung von Glukose während 120 Minuten ex-vivo	
Perfusion. ....	82
Abbildung 33: Leukozytenzahlen zu Beginn und am Ende der Perfusion. ....	83
Abbildung 34: Der Hämatokritverlauf während der Perfusion mit dem	
verbesserten System.....	85
Abbildung 35: Die Natriumkonzentration im Perfusat zu Beginn, nach 60	
Minuten und nach 120 Minuten Perfusion .....	87
Abbildung 36: Die Kaliumkonzentration im Perfusat zu Beginn, nach 60	
Minuten und nach 120 Minuten Perfusion. ....	89
Abbildung 37: Die Osmolarität des Perfusats zu Beginn und nach 120 Minuten	
Perfusion. ....	91
Abbildung 38: Sauerstoffverbrauch (Gruppe 2) .....	93

Abbildung 39: Sauerstoffverbrauch (Gruppe 3).....	94
Abbildung 40: Maltoseabsorptionstest (Gruppe 1) .....	96
Abbildung 41: Maltoseabsorptionstest (Gruppe 2) .....	97
Abbildung 42: Maltoseabsorptionstest (Gruppe 3) .....	98
Abbildung 43: Der Anteil der einzelnen Systemkomponenten an der gesamten Hämolyse.....	99
Abbildung 44: Korrelation zwischen Anstieg der Kaliumkonzentration und Anstieg von freiem Hämoglobin während 120 Minuten Perfusion. ....	100
Abbildung 45: Kaliumanstieg nach 120 Minuten Perfusion .....	101
Abbildung 46: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 1, HE, 70X).....	104
Abbildung 47: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 2, HE, 60 X).....	104
Abbildung 48: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 3, HE, 40X).....	105
Abbildung 49: Darm nach 120 Minuten ex-vivo Perfusion (Gruppe 3, PAS, 200X).....	105
Abbildung 50: Positive histologische Kontrolle (HE, 80X).....	106

## 8 Tabellarischer Anhang

### 8.1 Einzelwerte der Computeraufzeichnungen

#### Kap. 3.1.1 Flussraten

	Gruppe 1 n=14			Gruppe 2 n=11			Gruppe 3 n=8		
Zeit	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
00:05	3,82	1,33	0,36	3,43	1,90	0,57	3,18	0,97	0,34
00:10	4,83	1,99	0,53	3,72	1,60	0,48	3,46	1,11	0,39
00:15	5,36	1,98	0,53	3,91	1,68	0,51	3,01	1,14	0,40
00:20	5,34	1,62	0,43	4,36	1,64	0,49	3,51	1,08	0,38
00:25	5,52	1,39	0,37	4,75	1,64	0,50	3,98	0,95	0,34
00:30	5,49	1,57	0,42	5,03	1,45	0,44	3,83	1,51	0,53
00:35	5,41	1,61	0,43	5,11	1,52	0,46	3,85	1,32	0,47
00:40	5,03	1,35	0,36	5,29	1,45	0,44	3,96	1,24	0,44
00:45	4,35	1,29	0,35	5,31	1,49	0,45	4,15	1,16	0,41
00:50	3,75	1,66	0,44	5,74	1,57	0,47	4,29	1,32	0,47
00:55	3,41	1,89	0,51	5,90	1,56	0,47	4,41	1,45	0,51
01:00	3,01	1,76	0,47	6,20	1,45	0,44	4,61	1,33	0,47
01:05	2,55	1,78	0,47	6,35	1,43	0,43	4,69	1,46	0,51
01:10	2,59	1,37	0,37	6,47	1,40	0,42	4,56	1,80	0,64
01:15	2,01	1,44	0,38	6,58	1,34	0,40	4,54	1,74	0,61
01:20	1,86	1,37	0,37	6,82	1,29	0,39	4,53	1,86	0,66
01:25	1,62	1,43	0,38	6,98	1,27	0,38	4,36	1,96	0,69
01:30	1,42	1,43	0,38	7,16	1,18	0,36	4,64	1,76	0,62
01:35	1,30	1,33	0,36	7,16	1,16	0,35	4,73	1,79	0,63
01:40	1,18	1,25	0,33	7,26	1,19	0,36	4,24	1,61	0,57
01:45	1,11	1,19	0,32	7,29	1,22	0,37	3,79	1,67	0,59
01:50	1,07	1,14	0,30	7,13	1,32	0,40	4,06	1,67	0,59
01:55	0,98	1,10	0,29	7,06	1,53	0,46	4,59	1,84	0,65
02:00	0,95	1,05	0,28	7,08	1,56	0,47	4,79	1,47	0,52
Ø	3,08	1,47	0,39	5,92	1,45	0,44	4,16	1,47	0,52

### Kap. 3.1.2 Perfusionsdruck

	Gruppe 1 n=14			Gruppe 2 n=11			Gruppe 3 n=8		
Zeit	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
00:05	95,36	7,76	2,07	99,27	4,67	1,41	91,33	10,23	3,62
00:10	95,00	5,90	1,64	100,00	3,10	0,93	99,67	5,16	1,83
00:15	95,86	5,59	1,49	97,82	2,09	0,63	99,50	1,05	0,37
00:20	98,79	3,47	0,93	98,82	2,18	0,66	99,33	1,63	0,58
00:25	99,71	5,46	1,46	99,09	1,76	0,53	98,67	2,88	1,02
00:30	99,00	2,35	0,63	99,27	1,01	0,30	102,00	3,63	1,28
00:35	99,43	1,95	0,52	99,55	1,51	0,45	99,50	1,76	0,62
00:40	100,21	2,72	0,73	99,36	0,92	0,28	99,50	0,84	0,30
00:45	101,50	2,82	0,75	99,91	2,12	0,64	98,50	1,05	0,37
00:50	100,79	1,97	0,53	99,00	1,10	0,33	99,67	1,97	0,70
00:55	99,62	2,43	0,67	99,73	1,10	0,33	100,33	3,01	1,06
01:00	101,00	2,45	0,68	99,18	0,75	0,23	98,67	2,94	1,04
01:05	100,85	3,36	0,93	99,27	1,10	0,33	99,33	0,82	0,29
01:10	100,77	2,13	0,59	100,18	1,25	0,38	99,67	1,51	0,53
01:15	99,54	2,82	0,78	98,82	1,17	0,35	99,33	3,44	1,22
01:20	100,08	2,50	0,72	99,55	0,93	0,28	98,83	3,31	1,17
01:25	100,42	3,12	0,90	98,91	1,38	0,41	99,17	2,48	0,88
01:30	100,18	2,82	0,85	99,55	0,93	0,28	100,17	2,99	1,06
01:35	99,27	2,83	0,85	99,91	0,94	0,28	103,17	4,54	1,60
01:40	100,18	2,44	0,74	99,73	1,49	0,45	100,67	5,24	1,85
01:45	99,64	3,53	1,06	101,00	2,93	0,88	99,00	2,45	0,87
01:50	100,18	1,60	0,48	100,45	1,63	0,49	97,17	5,08	1,79
01:55	99,18	2,56	0,77	100,09	1,38	0,41	99,83	4,96	1,75
02:00	101,29	3,30	1,25	100,18	3,28	0,99	99,20	2,05	0,72
Ø									

### Kap. 3.1.3 Arterieller Sauerstoffpartialdruck

Zeit	Gruppe 1 n=14			Gruppe 2 n=11			Gruppe 3 n=8		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
00:05	222,00	63,63	17,01	225,00	89,37	26,95	269,43	66,12	23,38
00:10	182,15	41,27	11,03	220,36	81,28	24,51	193,71	57,50	20,33
00:15	178,23	21,08	5,63	196,18	70,14	21,15	175,29	49,76	17,59
00:20	177,15	23,14	6,19	167,64	33,65	10,14	164,86	43,32	15,32
00:25	176,08	27,54	7,36	160,27	32,97	9,94	163,57	35,56	12,57
00:30	175,77	26,77	7,15	154,27	31,82	9,59	168,00	31,36	11,09
00:35	176,69	25,24	6,75	158,73	25,53	7,70	157,00	33,20	11,74
00:40	179,62	23,65	6,32	150,36	20,66	6,23	150,00	35,51	12,55
00:45	182,38	19,32	5,16	153,73	17,42	5,25	155,00	34,97	12,36
00:50	185,46	31,45	8,41	156,00	29,88	9,01	159,71	23,47	8,30
00:55	187,00	23,57	6,30	156,73	32,92	9,93	159,86	25,76	9,11
01:00	187,31	18,63	4,98	161,45	29,33	8,84	159,00	33,08	11,69
01:05	186,85	25,05	6,69	169,64	26,08	7,86	161,29	48,00	16,97
01:10	190,00	21,37	5,71	171,55	26,39	7,96	165,14	54,70	19,34
01:15	188,46	26,64	7,12	171,36	21,46	6,47	168,71	62,17	21,98
01:20	194,77	29,69	7,93	170,36	23,75	7,16	166,71	53,24	18,82
01:25	195,00	25,43	6,80	176,91	25,09	7,56	169,14	53,83	19,03
01:30	200,73	27,22	7,27	182,82	27,93	8,42	175,71	47,92	16,94
01:35	200,30	22,57	6,03	187,73	28,87	8,71	175,43	50,26	17,77
01:40	205,30	15,92	4,25	190,73	26,01	7,84	198,86	61,79	21,85
01:45	206,80	21,40	5,72	191,91	25,60	7,72	215,71	44,96	15,90
01:50	210,70	28,79	7,69	193,73	24,74	7,46	195,57	50,03	17,69
01:55	209,60	29,79	7,96	194,73	26,75	8,07	181,71	56,30	19,90
02:00	215,44	27,33	7,30	200,27	31,09	9,38	186,71	71,27	25,20
Ø	192,24	26,94	7,20	177,60	33,70	10,16	176,51	46,84	16,56

Kap. 3.1.4 pH

	Gruppe 1 n=14			Gruppe 2 n=11			Gruppe 3 n=7		
Zeit	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
00:05	7,45	0,06	0,02	7,40	0,06	0,02	7,42	0,10	0,04
00:10	7,41	0,05	0,01	7,42	0,07	0,02	7,45	0,08	0,03
00:15	7,41	0,05	0,01	7,41	0,04	0,01	7,40	0,05	0,02
00:20	7,42	0,06	0,01	7,41	0,04	0,01	7,40	0,06	0,02
00:25	7,42	0,05	0,01	7,42	0,05	0,01	7,40	0,03	0,01
00:30	7,41	0,06	0,02	7,42	0,06	0,02	7,42	0,02	0,01
00:35	7,41	0,04	0,01	7,43	0,06	0,02	7,40	0,03	0,01
00:40	7,41	0,03	0,01	7,42	0,05	0,02	7,42	0,02	0,01
00:45	7,42	0,04	0,01	7,43	0,04	0,01	7,42	0,02	0,01
00:50	7,43	0,03	0,01	7,43	0,03	0,01	7,41	0,02	0,01
00:55	7,44	0,04	0,01	7,43	0,04	0,01	7,41	0,02	0,01
01:00	7,43	0,04	0,01	7,42	0,04	0,01	7,40	0,01	0,01
01:05	7,43	0,05	0,01	7,43	0,04	0,01	7,40	0,01	0,01
01:10	7,44	0,07	0,02	7,43	0,03	0,01	7,41	0,02	0,01
01:15	7,45	0,05	0,01	7,43	0,03	0,01	7,40	0,02	0,01
01:20	7,42	0,06	0,01	7,43	0,03	0,01	7,39	0,03	0,01
01:25	7,43	0,05	0,01	7,42	0,02	0,01	7,39	0,03	0,01
01:30	7,44	0,05	0,01	7,43	0,02	0,01	7,38	0,03	0,01
01:35	7,44	0,04	0,01	7,43	0,03	0,01	7,40	0,02	0,01
01:40	7,42	0,03	0,01	7,43	0,03	0,01	7,41	0,04	0,01
01:45	7,44	0,05	0,02	7,42	0,03	0,01	7,40	0,04	0,02
01:50	7,43	0,03	0,01	7,42	0,03	0,01	7,40	0,03	0,01
01:55	7,42	0,03	0,01	7,42	0,03	0,01	7,40	0,02	0,01
02:00	7,44	0,04	0,01	7,42	0,03	0,01	7,41	0,03	0,01
Ø	7,43	0,05	0,01	7,42	0,04	0,01	7,41	0,03	0,01

### Kap. 3.1.5 Temperatur

	Gruppe 1 n=12			Gruppe 2 n=10			Gruppe 3 n=8		
Zeit	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
00:05	37,29	0,44	0,13	37,62	0,27	0,09	37,54	0,37	0,13
00:10	37,2	0,48	0,14	37,6	0,39	0,12	37,5	0,32	0,11
00:15	37,3	0,42	0,12	37,7	0,34	0,11	37,5	0,31	0,11
00:20	37,3	0,42	0,12	37,7	0,35	0,11	37,4	0,33	0,12
00:25	37,2	0,37	0,11	37,7	0,40	0,12	37,4	0,33	0,12
00:30	37,3	0,32	0,09	37,7	0,38	0,12	37,4	0,34	0,12
00:35	37,3	0,29	0,08	37,7	0,36	0,12	37,4	0,35	0,12
00:40	37,3	0,30	0,09	37,7	0,43	0,13	37,4	0,33	0,12
00:45	37,4	0,30	0,09	37,7	0,42	0,13	37,5	0,35	0,12
00:50	37,4	0,24	0,07	37,7	0,40	0,13	37,6	0,39	0,14
00:55	37,4	0,21	0,06	37,7	0,42	0,13	37,6	0,39	0,14
01:00	37,4	0,25	0,07	37,6	0,41	0,13	37,6	0,40	0,14
01:05	37,4	0,26	0,07	37,6	0,41	0,13	37,7	0,38	0,13
01:10	37,5	0,27	0,08	37,6	0,37	0,12	37,6	0,41	0,14
01:15	37,5	0,33	0,10	37,6	0,37	0,12	37,7	0,39	0,14
01:20	37,5	0,35	0,10	37,7	0,33	0,11	37,7	0,38	0,13
01:25	37,5	0,34	0,10	37,7	0,38	0,12	37,6	0,35	0,12
01:30	37,4	0,35	0,10	37,7	0,40	0,13	37,6	0,31	0,11
01:35	37,4	0,38	0,11	37,7	0,47	0,15	37,6	0,26	0,09
01:40	37,4	0,35	0,10	37,7	0,43	0,14	37,5	0,22	0,08
01:45	37,4	0,40	0,12	37,7	0,45	0,14	37,5	0,21	0,08
01:50	37,4	0,43	0,13	37,7	0,47	0,15	37,6	0,21	0,08
01:55	37,4	0,45	0,13	37,7	0,43	0,14	37,6	0,25	0,09
02:00	37,4	0,46	0,13	37,8	0,51	0,16	37,6	0,30	0,10
Ø	37,4	0,35	0,10	37,7	0,40	0,13	37,5	0,33	0,12

## 8.2 Literaturverzeichnis

- 1 **Abu-Elmagd KM**, Reyes J, Fung JJ, Mazariegos G, Bueno J, Janov C, Colangelo J, Rao A, Demetris A, Starzl TE. Evolution of clinical intestinal transplantation: Improved outcome and cost effectiveness. *Transplant Proc* 1999; 31: 582-584
- 2 **Agar WT**, Hird FJR, Sidhu GS. Aktive absorption of aminoacids by intestine. *J Physiol London* 1953; 121: 255-263
- 3 **Ahren C**, Haglund U. Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. *Acta Physiol Scand* 1973; 88: 541-550
- 4 **Ascher NL**, Chen S, Hoffman R, Simmons RL. Maturation of cytotoxic effector cells at the site of allograft rejection. *Transplant Proc* 1981; 13: 1105-1107
- 5 **Ascher NL**, Chen S, Hoffman R, Simmons RL. Maturation of cytotoxic T-cells within sponge matrix allografts. *J Immunol* 1983; 131: 617-621
- 6 **Asfar S**, Atkinson P, Ghent C, Duff J, Wall W, Williams S, Seidman E, Grant D. Small bowel transplantation a live saving option for selected patients with intestinal failure. *Digest Des Sci* 1996; 41: 875-883
- 7 **Austen WG**, McLaughlin ED. In vitro small bowel perfusion. *Surg Forum* 1965; 16: 359-361
- 8 **Austyn JM**, Larsen CP. Migration patterns of dendritic leukocytes. *Transplantation* 1990; 49: 1-7
- 9 **Bakker H**, Bozzetti F, Staun M, Leon-Sanz M, Hebuterne X, Pertkiewicz M, Shaffer J, Thul P. Home parenteral nutrition in adults: A european multicentre survey in 1997

ESPEN-Home Artificial Nutrition Working Group. Clin Nutr 1999; 18: 135-140

10 **Barry MK**, Aloisi JD, Yeo CJ. Cholinergic agents modulate transport in the isolated, perfused ileum. J Surg Res 1995; 59: 681-686

11 **Benacerraf B**. Role of MHC gene products in immune regulation. Science 1981; 212: 1229-1238

12 **Bevilaqua MP**, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible-endothelial-leukocyte adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9238-9242

13 **Billiar TR**, Garberoglio C, Schraut WH. Maltose absorption as an indicator of small-intestinal allograft rejection. J Surg Res 1989; 137: 75-82

14 **Bishop GA**, Hall BM. Expression of leukocyte and lymphocyte adhesion molecules in the normal and transplanted kidney. Kidney Int 1989; 36: 1078-1085

15 **Bloch R**, Menge H, Lorenz-Meyer H, Riecken EO. Automated segmental small intestine perfusion. A method for the assessment of the intestinal resorption. Klin Wochenschr 1971; 49: 1218-1222

16 **Bolton EM**, Gracie JA, Briggs JD. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. J Exp Med 1989; 169: 1931-1946

17 **Braun F**, Schutz E, Laabs S, Hanack U, Sattler B, Lorf T, Wieland E, Oellerich M, Ringe B. Development of a porcine small bowel ex vivo perfusion model. Transplant Proc 1998; 30: 2613-2615

18 **Brenner BM**, Troy JL, Baltermann BJ. Endothelium-dependent vascular responses: Mediators and mechanisms. J Clin Invest 1989; 84: 1373-1378

- 19 **Brewer T**, Taube D, Bewick M. Effect of graft perfusion with two CD45 monoclonal antibodies on incidence of kidney allograft rejection. *Lancet* 1989; 333: 935-937
- 20 **Bueno J**, Ohwada S, Kocoshis S, Mazariegos GV, Dvorchik I, Sigurdsson L, Di Lorenzo C, Abu-Elmagd K, Reyes J. Factors impacting the survival of children with intestinal failure referred for intestinal transplantation. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 27-32, discussion 32-33
- 21 **Chain BM**, Kay PM, Feldmann M. The cellular pathway of antigen presentation: Biochemical and functional analysis of antigen processing in dendritic cells and macrophages. *Immunology* 1986; 58: 271-276
- 22 **Charles River Wiga GmbH**. Lewis Ratte. Hrsg: Charles River Wiga GmbH 1989: 5-8
- 23 **Chesnut RW**, Grey HM. Antigen presenting cells and mechanisms of antigen presentation. *Critical reviews in Immunology* 1985; 5: 263-316
- 24 **Chiu CJ**, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 25 **Chou CC**, Hsieh CP, Yu YM, Kviety P, Yu LC. Localization of mesenteric hyperemia during digestion in dogs. *Am J Physiol* 1976; 230: 583-589
- 26 **Clark CL**, Smith GJ, Crane PW, Price BA, Lear PA, Fabre JW, Wood RF. Reduction of graft-versus-host reactivity after small bowel transplantation: Ex vivo treatment of intestinal allografts with an anti-T cell immunotoxin; *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 220-225

- 27 **Coppen DE**, Davies NT. Glucose uptake and iron absorption by an isolated, vascularly and lumenally perfused preparation of rat small intestine. *Q J Exp Physiol* 1988; 73: 595-608
- 28 **Crissinger KD**, Granger DN. Mucosal injury induced ischemia and reperfusion in the piglet intestine: Influences of age and feeding. *Gastroenterology* 1989; 97: 920-926
- 29 **Dallman MJ**, Larsen CP, Morris PJ. Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: Analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991; 174: 493-496
- 30 **Darlington WA**, Quastel JH. Absorption of sugars from isolated surviving intestine. *Arch Biochem Biophys* 1953; 43: 194-207
- 31 **Davis MM**, Bjorkmann PJ. T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402
- 32 **DiMartini A**, Rovera GM, Graham TO, Furukawa H, Todo S, Funovits M, Lu S, Abu-Elmagd K. Quality of life after small intestinal transplantation and among home parenteral nutrition patients. *J Parenter Enteral Nutr* 1998; 22: 357-362
- 33 **Dubois RS**, Vaughan GD, Roy CC. Isolated rat small intestine with intact circulation. Norman JC(ed): *Organ Perfusion and Preservation* New York, Appleton Century Crofts 1968: 863-875
- 34 **Eloy R**, Raul F, Pousse A, Mirhom R, Anana A, Grenier JF. Ex vivo vascular perfusion of the isolated rat small bowel. Importance of the intestinal brush border enzyme-release in basal conditions. *Eur Surg Res* 1977; 9: 96-112
- 35 **Embley EH**, Martin CJ. The action of anesthetic quantities of chloroform upon the blood vessels of the bowel and the kidney, with an account of an artificial circulation

apparatus. *J Physiol London* 1905; 32: 147-158

36 **Faustmann DL**, Steinmann RM, Gebel HM, Hauptfeld V, Davie JM, Lacy PE. Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3864-3868

37 **Ferran C**, Stroka DM, Badrichani AZ, Cooper JT, Wrighton CJ, Soares M, Grey ST, Bach FH. A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood* 1998; 91: 2249-2258

38 **Fisher RB**, Parsons DS. A preparation of surviving rat small intestine for study of absorption. *J Physiol London* 1949; 110: 36-46

39 **Fishman JA**, Rubin RH . Infection in organ-transplant recipients. *NEJM* 1998; 338: 1741-1751

40 **Forbes RDC**, Parfrey NA, Gomersall M, Darden, AG, Guttman RD. Dendritic cell-lymphoid cell aggregation and major histocompatibility antigen expression during rat cardiac allograft rejection. *J Exp Med* 1986; 164: 1239-1258

41 **Ford HR**, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre LA, Simmons RL. Tumor necrosis factor, macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 1 production within sponge matrix allografts. *Transplantation* 1990; 50: 460-466

42 **Frankel W**, Zhang W, Afonso J, Klurfeld DM, Don SH, Laitin E, Deaton D, Furth EE, Pietra GG, Naji A, Rombeau JL. Glutamine enhancement of structure and function in transplanted small intestine in the rat. *JPEN* 1993; 17: 47-55

43 **Geng JG**, Bevilacqua MP, Moore KL. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343: 757-760

- 44 **Geppert TD**, Lipsky PE. Antigen presentation by cells that are not of bone marrow origin. *Reg Immunol* 1989; 2: 60-71
- 45 **Germain RN**. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986; 322: 687-689
- 46 **Goulet O**, Michel JL, Jan D, Lacaille F, Sarnaoki S, Revillon Y, Ricour C. Intestinal transplantation in pediatric patients: The European experience. *Transplant Proc* 1997; 29: 1785-1786
- 47 **Granger DN**, Richardson DI, Kvietys PR, Mortillaro NA. Intestinal blood flow. *Gastroenterology* 1980; 78: 837-863
- 48 **Grant D**. Current results of intestinal transplantation The International Intestinal Transplant Registry. *Lancet* 1996. 347: 1801-1803
- 49 **Grant D**. Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry Intestinal Transplant Registry. *Transplantation* 1999; 67: 1061-1064
- 50 **Grant D**. The Intestinal Transplant Registry 1997; Website ([www.lhsc.on.ca/itr/](http://www.lhsc.on.ca/itr/))
- 51 **Greiner JF**, Dauchel J, Eloy MR. Extracorporeal perfusion of excised canine small bowel segments. *Digestion* 1974; 10: 82 –94
- 52 **Greiner JF**, Wong P, Kachelhoffer J, Barth AM, Baruthio F, Clavert A, Weiss AG. Perfusions of isolated intestine in dogs. Description of a technic. Its value. *C R Seances Soc Biol Fil* 1967; 161: 2624-2627
- 53 **Gruber SA**, Xiao S, Hughes SE. Local regulation of allograft rejection. *Local Immunosuppression of Organ Transplants*. Chapman and Hall 1996; Chapter 1: 3-12

- 54 **Haberich FJ**, Herzer R, Aziz O, Dennhardt R. Intestinal resorption and secretion study. I. Technic of extracorporeal perfusion of a temporarily isolated intestinal segment in the unanesthetized rat. *Z Gesamte Exp Med* 1968; 148: 223-237
- 55 **Haglund UH**, Morris JB, Bulkley GB. Hemodynamic characterization of the isolated (denervated) parabiotically perfused rat jejunum. *Acta Physiol Scand* 1988; 132: 151-158
- 56 **Hall BM**, Saxe I, Dorsch SE. The cellular basis of allograft rejection in vivo: III. Restoration of first-set rejection of heart grafts by T helper cells in irradiated rats. *Transplantation* 1983; 36: 700-705
- 57 **Hall BM**. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51: 1141-1151
- 58 **Hall JG**. Studies of the cells in the afferent and efferent lymph of lymph nodes draining the site of skin homografts. *J Exp Med* 1967; 125: 737-754
- 59 **Hanson PJ**, Parsons DS. Metabolism and transport of glutamine and glucose in vascularly perfused small intestine rat. *Biochem J* 1977; 166: 509-519
- 60 **Hanson PJ**, Parsons DS. The utilization of glucose and production of lactate by in vitro preparations of rat small intestine: Effects of vascular perfusion. *J Physiol London* 1976; 255: 775-795
- 61 **Hardy MA**, Lau HT, Weber C, Reemtsma K. Pancreatic islet transplantation: Immuno-alteration with ultraviolet irradiation. *World J Surg* 1984; 8: 207-213
- 62 **Harmel RP Jr**. A simplified technique of small intestinal transplantation in the rat. *J Pediatr Surg* 1984; 19: 400-403
- 63 **Hartmann F**, Plauth M, Vieillard-Baron D, Bauder D. Isolated perfusion of the

small intestine of the rat with perfluorotributylamine as an artificial oxygen carrier. *Infusionsther Klin Ernahr* 1987; 14: 185-188

64 **Häyry P**, Renkonen R, Leszczynski D. Local events in graft rejection. *Transplant Proc* 1989; 21: 3716-3720

65 **Herbert J**, Roser B. Strategies of monoclonal antibody therapy that induce permanent tolerance of organ transplants. *Transplantation* 1988; 46: 128S-134S

66 **Hirayama H**, Xu X, Pang KS. Viability of the vascularly perfused, recirculating rat intestine and intestine-liver preparations. *Am J Physiol* 1989; 257: G249-G258

67 **Hutchison JD**, Undrill VJ, Porteous JW. Glucose translocation and metabolism in the rat jejunum perfused in once-through mode in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1200: 129-138

68 **Hutchison JD**, Undrill VJ, Porteous JW. Lactate is not a major product of glucose metabolism in the respiring jejunum perfused in the recirculation mode in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1115: 60-68

69 **Hutchison JD**, Undrill VJ, Porteous JW. The vascularly and lumenally perfused small intestine in vitro: Dissection technique and model system. *Lab Anim* 1991; 25: 168-183

70 **Illyes G**, Hamar J. Sequence of morphological alterations in a small intestinal ischaemia/reperfusion model of the anesthetized rat. A light microscopy study. *Int J Exp Pathol* 1992; 73: 161-172

71 **Iwai H**, Kuma SI, Inaba MM, Good RA, Yamashita T, Kumazawa T, Ikehara S. Acceptance of murine thyroid allografts by pretreatment of anti Ia antibody or anti dendritic cell antibody in vitro. *Transplantation* 1989; 47: 45-49

- 72 **Jacobs P**, Bothwell TH, Charlton RW. Intestinal iron transport: studies using a loop of gut with an artificial circulation. *Am J Physiol* 1966; 210: 694-700
- 73 **Jaffe EA**, Grulich J, Weksler BB, Hampel G, Watanabe K. Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol triphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 8557-8565
- 74 **Jeppesen PB**, Staun M, Mortensen PB. Adult patients receiving home parenteral nutrition in Denmark from 1991 to 1996: Who will benefit from intestinal transplantation? *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 839-846
- 75 **Johnson L**. Propulsive motility and intraluminal pressure variations in isolated, homologously perfused small intestine. *Acta Chir Scand* 1972; 138: 834-843
- 76 **Johnsson C**, Scheynius A, Tufveson G. Intravenous or cold ex vivo administration of monoclonal antibodies for conditioning of rat small-bowel allografts. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 916-920
- 77 **Jordan ML**, Carlson A, Hoffman RA, Simmons RL. Lipoxygenase pathway inhibition impairs the allograft response. *Surgery* 1987; 102: 248-255
- 78 **Kavin H**, Levin NW, Stanley MM. Isolated perfused rat small bowel - technic, studies of viability, glucose absorption. *J Appl Physiol* 1967; 22: 604-611
- 79 **Klimberg VS**, Souba WW, Salloum RM, Holley DT, Hautamaki RD, Dolson DJ, Copeland III EM. Intestinal glutamine metabolism after massive small bowel resection. *Am J Surg* 1990; 159: 27-35
- 80 **Klimberg VS**, Souba WW. The importance of intestinal glutamine metabolism in maintaining a healthy gastrointestinal tract and supporting the body's response to injury

and illness. Surg Ann 1990: 61-76

81 **Klinkert WEF**, LaBadie JH, Bowers WE. Accessory and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. J Exp Med 1982; 156: 1-19

82 **Koltun WA**, Bloomer MM, Vary TC. Glutamine does not increase ammonia in systemically drained small bowel transplants. J Surg Res 1994; 56: 102-107

83 **Kraneveld AD**, Koster AS, Nijkamp FD. Microvascular permeability in isolated vascularly perfused small intestine of rats. Am J Physiol 1994; 266: G1170-G1178

84 **Kupiec-Weglinski JW**, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from blood and T cell dependent and independent entry to lymphoid tissues. J Exp Med 1988; 167: 632-645

85 **Kupiec-Weglinski JW**, Bordes-Aznar J, Clason AE. Migration patterns of lymphocytes in untreated and immunologically manipulated recipients of organ allografts. Transplantation 1982; 33: 593-598

86 **Lafferty K**. Immunogenicity of foreign tissues. Transplantation 1980; 29: 179-182

87 **Lafferty KJ**, Cooley MA, Woolnough S, Walker KZ. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. Science 1975; 188: 259-261

88 **Lafferty KJ**, Prowse SJ, Simeonovic CJ. Immunobiology of tissue transplantation: A return to the passenger leukocyte concept. Ann Rev Immunol 1983; 1: 143-173

89 **Larsen CP**, Austyn JM, Morris PJ. The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Ann Surg 1990; 212: 308-315

90 **Larsen CP**, Barker H, Morris PJ, Austyn JM. Failure of mature dendritic cells of the host to migrate from the blood into cardiac or skin allografts. *Transplantation* 1990; 50: 294-301

91 **Larsen CP**, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. *J Exp Med* 1990; 171: 307-314

92 **Lechler RI**, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982; 155: 31-41

93 **Lee TK**, Langrehr JM, Moynihan HL, Stangl MJ, Lee KK, Schraut WH. Failure of donor irradiation to prolong allograft survival in small bowel transplantation in rats. *Transplant Proc* 1992; 24: 1183-1184

94 **Levine JS**, Jacobsen ED. Intestinal Ischemic Disorders. *Dig Dis* 1995; 13: 3-24

95 **Levitt MD**, Fetzer CA, Kneip JM, Bond JH, Levitt DG. Quantitative assessment of luminal stirring in the perfused small intestine of the rat. *Am J Physiol* 1987; 252: G325-G332

96 **Lew JI**, Zhang W, Koide S, Smith R J, Rombeau JL. Glutamine improves cold-preserved small bowel graft structure and function following ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 1996; 28: 2605-2606

97 **Lloyd DM**, Gaber AO, Buckingham M, Stuart FP, Thistlethwaite JR. Prolonged survival of rat pancreas allografts by ex vivo perfusion with monoclonal antibodies specific for class II MHC antigens. *Surgical Forum* 1987; 38: 375-377

98 **Lojacono L**, Maisano A, Butti A, Zucchetti F, Conti A, Breccia PA, Tamborini G, Bellavia A, Fianchini A. Technical aspects of perfusion of the isolated small intestine.

Chir Patol Sper 1968; 6: S1-S13

99 **Lojacono L**, Zucchetti F, Butti A, Tamborini G, Fianchini A, Cagossi M, Pigliucci GM. Experimental perfusion of isolated small intestine at normal temperature. Chir Patol Sper 1971; 19: 227-291

100 **Lovland BE**, Hogarth PM, Ceredig RN, McKenzie IFC. Cells mediating graft rejection in the mouse Lyt 1 cells mediate skin graft rejection. J Exp Med 1981; 153: 1044-1057

101 **Lucrecia A**, Benoit JN, Granger DN. A rat model for studying the intestinal circulation. Am J Physiol 1984; 246: G56-G61

102 **Lundsgaard E**. Über die aerobe Glykolyse des Darms. Physiol USSR 1940; 29: 311-317

103 **Mackay CR**, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. J Exp Med 1990; 171: 801-817

104 **Majno PE**, Licker M, Kadry Z, Buhler L, Morel DR, Morel Ph. Effect of Dopamine, Norepinephrine, and Prostaglandin-E1 on Graft Perfusion in Small Bowel Transplantation in Pigs. Transplant Proc 1996; 28: 2549-2550

105 **Margreiter R**. Clinical intestinal transplantation: European experience in adults. Transplant Proc 1997; 29: 1790-1791

106 **McConnell M**, Hall BM. Comparison of CD4 and CD8 cell reactivity in high and low responder combinations in the rat. Transplant Proc 1989; 21: 3294-3295

107 **McKenzie JL**, Beard ME J, Hart DNJ. The effect of donor pretreatment on interstitial dendritic cell content and rat cardiac allograft survival. Transplantation 1984;

38: 371-376

108 **Medawar PB.** The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat* 1944; 78: 176-199

109 **Minor T,** Klauke H, Isselhard W. Assessment of intestinal integrity after ischemic preservation by luminal and vascular perfusion in vitro. *Eur Surg Res* 1997; 29: 246-253

110 **Misiakos EP,** Wepler D, Bakonyi A, Nery JR, Pinna AD, Kato T, Rodriguez M, Ruiz P, Thompson J, Ricordi C, Tzakis AG. Clinical outcome of intestinal transplantation at the University of Miami. *Transplant Proc* 1999; 31: 569-571

111 **Miyazaki K,** Sunada K, Iseki K, Arita T. Simultaneous vascular and luminal perfusion of rat small intestine. *Chem Pharm Bull Tokyo* 1986; 34: 3830-3835

112 **Moen T,** Lamm L, Berger L. The effect of matching for HLA on cadaveric renal graft survival in Scandia-transplant. *Transplant Proc* 1986; 18: 13-14

113 **Noguchi Y,** James JH, Fischer JE, Hasselgren P-O. Increased glutamine consumption in small intestine epithelial cells during sepsis in rat. *Am J Surg* 1996; 172: 199-205

114 **Öhnell R.** The artificially perfused mammalian intestine as a useful preparation for studying intestinal absorption. *J Cell Comp Physiol* 1939; 13: 155-159

115 **Opelz A,** Terasaki PE. Studies on the strength of HLA antigen in related donor kidney transplants. *Transplantation* 1977; 24: 106-111

116 **Orosz CG,** Bishop DK, Ferguson RM. In vivo mechanisms of alloreactivity: VI. Evidence that alloantigen deposition initiates both local and systemic mechanisms that influence CTL accumulation at a graft site. *Transplantation* 1989; 48: 818-824

117 **Orosz CG**, Horstemeyer B, Zinn NE, Bishop DK, Ferguson RM. In vivo mechanisms of alloreactivity: V. Influence of graft implantation on the activation and redistribution of graft reactive CTL. *Transplantation* 1989; 48: 519-523

118 **Osborn L**, Hession R, Tizard R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989; 59: 1203-1211

119 **Park PO**, Haglund U. Regeneration of small bowel mucosa after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1992; 20: 135-139

120 **Ploeg RJ**, D'Alessandro AM. Intestinal transplantation: A clinical update. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30 Suppl 212: 79-89

121 **Pober JS**, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990; 50: 537-544

122 **Pober JS**, Gimbrone MA, Lapierre LA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986; 137: 1893-1896

123 **Porteous JW**, Hutchison JD, Undrill V. The lumenally- and vascularly-perfused small intestine as an experimental system for the study of translocation and metabolism. *Proc Nutr Soc* 1984; 43: 141-160

124 **Pugh CW**, MacPherson GG, Steer HW. Characterization of non-lymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 1983; 157: 1758-1779

125 **Qin L**, Pahud DR, Ding Y, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr, Bromberg JS. Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by Starburst

polyamidoamine dendrimers. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 553-560

126 **Quaedackers JS**, Beuk RJ, Bennet L, Charlton A, oude Egbrink MG, Gunn AJ, Heineman E. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transplant Proc* 2000; 32: 1307-1310

127 **Renkonen R**, Soots A, von Willebrand E, Häyry P. Lymphoid cell subclasses in rejecting renal allograft in the rat. *Cell Immunol* 1983; 77: 187-195

128 **Rice GE**, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (ICAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes: A CD11/CD18 independent adhesion mechanism. *J Exp Med* 1990; 171: 1369-1374

129 **Riecken EO**. Kap.31 Dünndarm. In: *Klinische Pathophysiologie*. Hrsg.: Siegenthaler W. Thieme, Stuttgart, New York 1994; 663-676

130 **Roig T**, Vinardell MP, Ruberte J, Fernandez E. Double luminal and vascular perfusion of chicken jejunum: Studies on 3-O-methyl-D-glucose absorption. *Pflugers Arch* 1993; 425: 365-372

131 **Rovera GM**, DiMartini A, Schoen RE, Rakela J, Abu-Elmagd K, Graham TO. Quality of life of patients after intestinal transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1141-1145

132 **Ruiz JO**, Schultz LS, Hendrickx J, Castelfranchi L, Meyer W, Aquino CJ, Lillehei RC. Isolated intestinal perfusion: A method for assessing preservation methods and viability before transplantation. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1971; 17: 42-48

133 **Sakai K**, Akima M, Hinohara Y, Sasaki M, Niki R. Vascularly perfused rat small intestine: a research model for drug absorption. *Jpn J Pharmacol* 1980; 32: 231-241

- 134 **Sanders ME**, Makgoba MW, Shaw S. Human naive and memory T cells: Reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* 1988; 9: 195-199
- 135 **Sayegh MH**, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *NEJM* 1998; 338:1813-1821
- 136 **Schanker LS**, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CA. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J Pharmacol Exptl Therap* 1958; 122: 81-88
- 137 **Scheid P**. Atmung: Physik der Gase. In: *Lehrbuch der Physiologie*. Hrsg: Klinke R, Silbernagl S. Thieme, Stuttgart, New York 1994: 216-218
- 138 **Schoenberg MH**, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386
- 139 **Schwartz BR**, Wayner EA, Carlos TM, Ochs HD, Harlan JM. Identification of surface proteins mediating adherence of CD11/CD18-deficient lymphoblastoid cells to cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1990; 85: 2019-2027
- 140 **Sherwood RA**, Brent L, Rayfield LS. Presentation of alloantigens by host cells. *Eur J Immunol* 1986; 16: 569-574
- 141 **Smith CW**, Rothlein R, Hughes BJ. Recognition of an endothelial determinant for CD-18 dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 1988; 82: 1746-1754
- 142 **Smith GJ**, Ingham-Clark C, Crane P, Lear P, Wood RF, Fabre JW. Ex vivo perfusion of intestinal allografts with anti-T cell monoclonal antibody/ricin A chain conjugates for the suppression of graft-versus-host disease. *Transplantation* 1992; 53: 717-722

- 143 **Smith KA.** T cell growth factor. *Immunol Rev* 1980; 51: 337-357
- 144 **Snell GD.** The homograft reaction. *Ann Rev Microbiol* 1957; 11: 439-448
- 145 **Sone Y, Sakagami K, Orita K.** Effect of ex vivo perfusion with anti Ia monoclonal antibodies on rat cardiac allograft survival. *Transplant Proc* 1987; 19: 599-604
- 146 **Soots A, Hayry P.** Prolongation of rat cardiac allograft survival by donor pretreatment: Screening of antineoplastic drugs. *Transplantation* 1978; 25: 259-264
- 147 **Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW.** Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN* 1985; 9: 608-617
- 148 **Spencer SC, Fabre JW.** Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tissue of rat heart. *J Exp Med* 1990; 170: 1839-1847
- 149 **Stangl MJ, Krapp J, Theodorou D, Eder M, Hammer C, Land W, Schildberg FW.** Computer-Assisted ex vivo, Normothermic Small Bowel Perfusion. *Eur Surg Res* 2000; 32: 100-106
- 150 **Stangl MJ, Lee KK, Banner B, Schraut WH.** Ex vivo normothermic perfusion of small-bowel grafts prior to transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 2436-2438
- 151 **Stangl MJ, Lee KK, Lee TK, Moynihan HL, Schraut WH.** Graft pretreatment with monoclonal antibodies prior to small-bowel transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 2483-2484
- 152 **Steinmann RM, Witmer MD.** Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 5132-

153 **Streiter RM**, Kunkel SM, Showell HJ. Endothelial gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS and IL-1. *Science* 1989; 243: 1467-1469

154 **Strober S**, Gowans JL. The role of lymphocytes in the sensitization of rats to renal homografts. *J Exp Med* 1965; 122: 347-359

155 **Strom TB**, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: Identity, specificity and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977; 118: 2020-2026

156 **Swerdlow SH**, Antonioli DA, Goldman H. Intestinal infarction: A new classification. *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105: 218

157 **Takata N**, Yamaguchi Y, Mori K. Prolonged survival of rat hepatic allografts after total-body irradiation of the donors. *Transplantation* 1992; 54: 215-218

158 **Todo S**, Tzakis A, Reyes J, Abu Elmagd K, Casavilla A, Fung, Starzl TE. Intestinal transplantation in humans under FK 506. *Transplant Proc* 1993; 25: 1198-1199

159 **Tzakis AG**, Wepler D, Khan MF, Koutouby R, Romero R, Viciano AL, Raskin J, Nery JR, Thompson J. Mycophenolate mofetil as primary and rescue therapy in intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1998, 30: 2677-2679

160 **Varani J**, Ginsburg I, Schuger L. Endothelial cell killing by neutrophils: Synergistic interaction of oxygen products and proteases. *Am J Pathol* 1989; 135: 435-438

161 **Whatley RE**, Zimmermann GA, McIntyre TM, Prescott SM. Endothelium from diverse vascular sources synthesizes platelet activating factor. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 321-331

162 **Williams JW**, McClellan T, Peters TG, Nag S, Dean P, Banner B, Vera SR, Stenz F. Effect of pretransplant graft irradiation on canine intestinal transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 167: 197-204

163 **Windmueller HG**, Spaeth AE, Ganote CE. Vascular perfusion of isolated gut: Norepinephrine and glucocorticoid requirement. *Am J Physiol* 1970; 218: 197-204

164 **Windmueller HG**, Spaeth AE. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys* 1975; 171: 662-672

165 **Windmueller HG**, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974; 249: 5070-5079

166 **Windmueller HG**, Spaeth AE. Vascular autoperfusion of rat small intestine in situ. *Methods Enzymol* 1981; 77: 120-129

167 **Windmueller HG**, Spaeth AE. Vascular perfusion of rat small intestine: Metabolic studies with isolated and in situ preparations. *Fed Proc* 1977; 36: 177-181

168 **Yamabe K**, Shimizu S, Kamiike W, Waguri S, Eguchi Y, Hasegawa J, Okuno S, Yoshioka Y, Ito T, Sawa Y, Uchiyama Y, Tsujimoto Y, Matsuda H. Prevention of hypoxic liver cell necrosis by in vivo human bcl-2 gene transfection. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 217-223

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Jan David Krapp  
Wohnort: Bavariastr. 1a  
80336 München  
Geburt: 18. April 1972 in Ratingen als Sohn von  
Achim Krapp und Christiane Krapp-Nespital  
Familienstand: ledig

### Schulbesuch

1978 - 1982 Grundsule, München-Solln  
1982 - 1983 Staatliches Gymnasium Pullach,  
Neusprachlicher Zweig  
1983 - 1991 Günter-Stöhr-Gymnasium, München-Solln,  
Neusprachlicher Zweig  
Juli 1991 Allgemeine Hochschulreife

### Wehrersatzdienst

September 1991 - Johanniter-Unfall-Hilfe, Kreisverband München,  
Dezember 1992 im Rettungsdienst

### Studium

Mai 1993 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians Universität München  
März 1995 Physikum

August 1996	1. Staatsexamen
September 1998	2. Staatsexamen
Oktober 1998 – August 1999	Praktisches Jahr: 1. Tertial: Orthopädie, Klinikum Großhadern 2. Tertial: Innere Medizin, Klinikum Großhadern 3. Tertial: Chirurgie, Klinikum Großhadern
November 1999	3. Staatsexamen Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote "Gut" bestanden

### Berufliche Tätigkeit

November 1995 – März 1996	Koassistent beim Studentenkurs der Makroskopischen Anatomie
November 1997 – März 1998	Koassistent beim Studentenkurs der Makroskopischen Anatomie Jeweils an der Anatomischen Anstalt der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. R. Putz)
Januar 2000 – Juni 2001	AiP an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F. W. Schildberg)
August 2001	Approbation als Arzt
Seit Oktober 2001	Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. J. R. Siewert)