

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

Bestimmung der regionalen Organdurchblutung
mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären

Entwicklung und Validierung einer neuen
Probenverarbeitung

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

vorgelegt von
Stephan Raab
aus
Miltenberg

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schad
Prof. Dr. S. Nees

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2003

1	Einleitung.....	6
1.1	Indirekte Methoden zur Bestimmung des Blutflusses.....	7
1.1.1	Niere.....	7
1.1.2	Leber.....	7
1.2	Direkte Methoden zur Bestimmung des Blutflusses.....	8
1.2.1	Physikalische Meßgeräte.....	8
1.2.2	Tracer.....	9
2	Material und Methodik.....	15
2.1	SPU - Sample Processing Unit.....	15
2.1.1	Bestandteile der SPU.....	16
2.1.2	Filtergewebe.....	18
2.1.3	Kochgefäß.....	18
2.2	Verarbeitung von Gewebe- und Referenzblutproben.....	19
2.2.1	Verwendete Chemikalien.....	19
2.2.2	Wägung und Digestion.....	22
2.2.3	Filtration und Reinigung.....	23
2.2.4	Farbauslösung.....	25
2.3	Variation des Protokolls für verschiedene Organgewebe.....	26
2.4	Verarbeitung der Blutprobe.....	27
2.5	Bestimmung der Farbkonzentration.....	28
2.5.1	Fluoreszenz.....	28
2.5.2	LS50B.....	30
2.6	Automatisierung der Methode.....	32
2.6.1	Roboter.....	32
2.6.1.1	Bestandteile.....	32
2.6.1.2	Software.....	35
2.6.1.3	Programmcode.....	37
2.6.2	Fluoreszenzmessung.....	41
2.7	In vitro Versuchsteil.....	42
2.7.1	Dichte der FM.....	42
2.7.2	Einfluß der verwendeten Flüssigkeiten.....	42
2.7.3	Linearität von Anzahl FM zu Intensität.....	43
2.7.4	Einfluß der Probenverarbeitung.....	43
2.7.5	Rückgewinnung der FM mit der SPU.....	45
2.7.6	Wiederverwendung der Filter.....	46
2.7.7	Aufbereitung der Mikrosphären.....	46
2.8	In vivo Experiment.....	48
2.8.1	Versuchstiere.....	48
2.8.2	Narkoseführung.....	48
2.8.3	Überwachung.....	49
2.8.4	Chirurgische Präparation.....	50
2.8.5	Injektion der Mikrosphären.....	51
2.8.5.1	Vorbereitung.....	51
2.8.5.2	Injektion.....	53
2.9	Probenverarbeitung.....	56
2.9.1	Präparation der Organe.....	56
2.9.2	Fixierung der Gewebeproben.....	56
2.9.3	Dissektion der Organe.....	56
2.10	Berechnung und Statistik.....	58

2.10.1	Radioaktive Methode	58
2.10.2	Fluoreszenz-Methode	59
2.11	Statistische Auswertung	61
2.12	Kontrolle der automatischen Verarbeitung durch den Roboter	62
3	Ergebnisse	63
3.1	In vitro Versuche	63
3.1.1	Dichte der FM	63
3.1.2	Einfluß der verwendeten Chemikalien	63
3.1.3	Linearität der Fluoreszenzintensität zur FM-Anzahl	65
3.1.4	Einfluß der Probenverarbeitung	66
3.1.5	Wiederfindung der FM mit der SPU	68
3.1.6	Wiederverwendung der Filter	69
3.1.7	Aufbereitung der Mikrosphären	69
3.2	In vivo-Experimente	71
3.2.1	Physiologische Parameter	71
3.2.2	Vergleich der Blutflußwerte RM versus FM	72
3.2.3	Regionaler Blutfluß der Leber	72
3.2.4	Regionaler Blutfluß der Niere	77
3.2.5	Qualitätskontrolle	82
4	Diskussion	83
4.1	Ziel der Arbeit	83
4.2	Mikrosphären	84
4.2.1	Homogene Verteilung	84
4.2.2	Verhalten im Blutstrom	86
4.2.3	Komplette Extraktion	87
4.2.4	Verbleiben der Tracer	90
4.2.5	Beachtung von Artefakten	92
4.2.6	Meßgenauigkeit	94
4.3	In vivo Experiment	95
4.3.1	Injektion	95
4.3.2	Verteilung im Blutkreislauf	96
4.3.3	Verbleib der Farbstoffe in den Mikrosphären	97
4.3.4	Dissektion	99
4.3.5	Blutreferenz	99
4.4	Meßgenauigkeit	101
4.4.1	Einfluß der Mikrosphären auf den Organismus	102
4.4.2	Wiederfindung der FM	104
4.4.2.1	Spezifische Dichte von FM und Digestionsflüssigkeit	105
4.4.2.2	Fluoreszenzverlust durch nicht neutrale pH-Werte	107
4.4.3	Verarbeitungsprotokolle	108
4.4.3.1	Farbige Mikrosphären	108
4.4.3.2	Fluoreszierende Mikrosphären	110
4.4.3.3	Entwicklung der SPU	113
4.4.3.4	Entwicklung des Verarbeitungsprotokolles	115
4.4.4	Differenzierung der Tracersubstanzen	116
4.4.5	Statistische Auswertung der Tierversuche	117
4.5	Reliabilität	118
4.6	Arbeitsaufwand und Kosten	119
5	Schlussfolgerung	121
6	Zusammenfassung	123

7	Literaturverzeichnis	128
8	Eigene Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Arbeit	135
9	Im Rahmen dieser Arbeit geschützte Produkte	137
10	Lebenslauf.....	138
11	Danksagung	139

1 Einleitung

*„So sah ich den Kreislauf des Blutes gleich in Gestalt
eines prächtigen Purpurstromes, an welchem wie ein
bleiches Schemen das weißgraue Nervenwesen saß, eine
gespenstische Gestalt,...“*

Gottfried Keller: Der Grüne Heinrich, Band 4

Die Faszination des Blutkreislaufes zieht sich seit seiner Entdeckung (W. Harvey, 1629) durch die Epochen der Literaturgeschichte. Kommt er zur Sprache wird jedoch vielmehr der emotionelle Zustand des Protagonisten beschrieben als sein medizinischer.

In der Entwicklung zur modernen Medizin sind eine Vielzahl von Entdeckungen und Erkenntnissen eng mit der Erforschung der Zirkulation des Blutes verbunden. Grundvoraussetzung ist hierbei aber immer, daß der Blutfluß quantifiziert werden kann. So entwickelte bereits 1870 FICK ein Prinzip zur Messung des Herzzeitvolumens. Dieses Prinzip wurde dann 1970 von SWAN, GANZ et al. mittels der Kathetertechnik des Herzens verbessert. Mit diesem nach den Erstbeschreibern benannten Katheter konnte nun die Makrohämodynamik in vivo repetitiv quantifiziert werden.

Viele Phänomene und Vorgänge lassen sich aber erst beschreiben, wenn man nicht nur den Blutfluß des gesamten Organismus, sondern auch die Durchblutung einzelner Organe bzw. deren Regionen kennt. Einige Ansätze zur Bestimmung der regionalen Organdurchblutung sollen im Folgenden erläutert werden.

1.1 Indirekte Methoden zur Bestimmung des Blutflusses

1.1.1 Niere

Ein Versuchsansatz hierbei war die Annahme, daß die Durchblutung vieler Organe eng an deren Funktion gekoppelt ist. So injizierte man beispielsweise p-Aminohippursäure (PAH) intravenös und bestimmte deren Konzentration im Urin (GANS, 1966). PAH wird im proximalen Tubulus der Niere sezerniert und nicht wieder resorbiert. Diese Eigenschaft macht sie dem endogenen Harnstoff überlegen. Allerdings unterliegt die PAH-Ausscheidung durch die Niere nicht alleine der Organdurchblutung, sondern die Ausscheidung könnte auch durch toxische Veränderungen im Tubulus oder durch Interaktion mit anderen Substanzen vermindert werden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, daß die Niere nur als Gesamtorgan betrachtet werden kann. So ist z.B. eine Unterscheidung der Durchblutung zwischen Cortex und Medulla nicht möglich. Auch würde eine Reduktion der Sekretionsleistung durch beispielsweise einen partiellen Niereninfarkt den Rückschluß zulassen, daß sich die Perfusion in allen Teilen des Organes vermindert hat.

1.1.2 Leber

In Analogie zur Niere wäre es ebenfalls denkbar, bei der Leber über die Syntheseleistung oder die Gallenproduktion einen Rückschluß auf die Organfunktion und somit auf die Durchblutung zu treffen. Diese Möglichkeit wird jedoch dadurch eingeschränkt, daß die Gallenproduktion unter physiologischen Bedingungen ein guter Marker für die Organfunktion der Leber ist, sie jedoch sehr vielen anderen Faktoren wie z.B. nutritiven und toxischen sowie Veränderungen des enterohepatischen Kreislaufes u.v.a. unterliegt.

Ebenso ist es wie bei der Niere unmöglich, zwischen verschiedenen Regionen des Organs zu differenzieren.

1.2 Direkte Methoden zur Bestimmung des Blutflusses

1.2.1 Physikalische Meßgeräte

Neben den oben genannten indirekten Methoden der Blutflußbestimmung gibt es verschiedene Ansätze, den Blutfluß in einem Blutgefäß direkt zu messen. So kann mit Hilfe der elektromagnetischen Induktion der Blutfluß direkt bestimmt werden (ASHLEY et al. 1992). Dabei wird eine stromdurchflossene Spule um das Blutgefäß gelegt. Es wird nun die Änderung des von ihr erzeugten elektromagnetischen Feldes gemessen. Diese Änderung wiederum erlaubt den Rückschluß auf das durchströmende Blutvolumen.

Eine weitere Möglichkeit, den Blutfluß im Gefäß zu bestimmen, ist die Verwendung des Dopplereffektes. Dieses Verfahren wird auch in der Echokardiographie eingesetzt. Dabei wird ein Ultraschallimpuls ausgesendet und wieder empfangen. Besteht zwischen gesendeter und empfangener Wellenlänge ein Unterschied, so bewegt sich das schallreflektierende Medium. Ausmaß und Vorzeichen der Wellenlängenänderung gibt dann Auskunft über die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes.

Mit der Eigenschaft des Lichts als Welle machte sich SMITS 1986 den Dopplereffekt zu Nutze. Er entwickelte ein Laser-Doppler-Velocimeter. Ein Laserstrahl wird unter einem möglichst flachen Winkel auf ein Gefäß gerichtet. Dort wird er an den Erythrozyten reflektiert. Mit Hilfe der Phasenverschiebung des reflektierten Lichtes kann die Blutflußgeschwindigkeit berechnet werden (NEUTZE et al., 1968).

Eine derartige Flowprobe haben auch KVIETYS et al. 1985 verwendet. Bei ihrem Experiment bestimmten sie die regionale Organdurchblutung der Darmmucosa mittels dreier unterschiedlicher Methoden. Sie benützten eine Flowprobe, bestimmten die H_2 -Clearance und verglichen die Ergebnisse mit den Daten, die sie mit Hilfe der Mikrosphären-Methode erhielten.

1.2.2 Tracer

Ein wesentlicher Nachteil der oben beschriebenen direkten Nachweismethode ist, daß der Blutfluß nur in einzelnen Arterien bestimmt werden kann. Eine Unterscheidung einzelner Organregionen wie z.B. am Herzen in myokardiales Endokard, Myokard und Epikard ist hierbei aus methodischen Gründen nicht möglich. Für eine höhere Auflösung bei der Untersuchung der Organe ist somit eine Messung „vor Ort“ notwendig. Geeignet hierfür sind Partikel oder Substanzen, die in die Blutbahn injiziert werden, sich dann im Körper verteilen und in den Organen nachweisbar sind. Die Konzentration dieser Substanzen pro Meßregion läßt dann auf die Organperfusion rückschließen.

1956 verwendete SAPIRSTEIN radioaktive Kaliumlösung (K^{42}), welche er injizierte und dann die Anzahl der radioaktiven Zerfälle in den Organproben bestimmte. Einen ähnlichen Versuch führten MESCHIA et al. 1967 durch. Diese Gruppe verwendete jedoch nicht ein radioaktives Kaliumisotop sondern Antipyrin. In diesen Experimenten war es somit möglich, den Blutfluß simultan im gesamten Organismus zu quantifizieren. Allerdings ist bei der Verwendung dieser Substanzen nur eine einzige Injektion möglich, und es besteht deshalb die Notwendigkeit mehrere Tierexperimente für die jeweils zu bestimmenden Zeitpunkte durchführen zu müssen, um Veränderungen der Perfusion messen zu können. Auch konnte keine Aussage über Shuntrate, Rezirkulation oder Veränderung durch Metabolisierung getroffen werden.

Um eine Rezirkulation der Messsubstanzen zu vermeiden, versuchte man die Trägermaterialien zu vergrößern, so daß sie im der endarteriellen Bereich der Strombahn hängen bleiben (BAISINGWAIGHTE et al., 1987 und 1990). Als Substanz wurden radioaktiv markierte Albumine verwendet. Die Verwendung von radioaktiv markiertem Albumin findet heute noch Anwendung in der Radiologie, um Perfusionsszintigramme zu erstellen. Ein Problem dieser Methode ist jedoch, daß Albumin metabolisiert wird und die radioaktiven Substanzen ausgewaschen werden.

Die Weiterentwicklung der Methode bedurfte demnach einer inerten Trägersubstanz. Die Kunststofftechnologie war inzwischen soweit vorangeschritten, daß Polystyren-Kugeln in der Größenordnung von unter 100 µm mit der nötigen Genauigkeit hergestellt werden konnten. Als optimale Größe stellte sich ein Durchmesser von 9 µm bzw. 15 µm heraus (UTLEY et al. 1973). Somit entspricht die Größe der Mikrosphären in etwa der der zellulären Bestandteile des Blutes. Kleinere Größen würden durch die Kapillaren hindurchfließen. Größere Durchmesser könnten die Mikrohämodynamik in vorgeschalteten Arteriolen verändern.

Diese Mikrosphären werden in den linken Vorhof (u. a. BUCKBERG et al., 1971 und KOBAYASHI et. al., 1994) injiziert (Abb. 1-1) und verteilen sich homogen im Blutstrom. Von diesem werden sie im arteriellen Schenkel des Blutkreislaufes bis zum kapillären Endstromgebiet transportiert. Dort werden sie aufgrund ihrer Größe zurückgehalten (ARCHIE et al., 1973).

Während der Injektion wird aus einer Arterie (NEUTZE et al. 1968) eine arterielle Referenzprobe entnommen. Das Blut wird mittels einer Pumpe mit einer konstanten Abugsgeschwindigkeit entnommen. Dieses Vorgehen liefert ein virtuelles Organ mit bekanntem Blutfluß (i. e. Pumpengeschwindigkeit). Zu diesem virtuellen Organ können alle Gewebeproben in Relation gesetzt werden und man kann somit den Blutfluß quantifizieren.

Nach Beendigung des Experimentes werden die Organe entnommen. Diese werden nach einem hierarchischen Schema aufgeteilt. Dabei können auch unterschiedliche Regionen eines Organs getrennt von einander untersucht werden. So kann z. B. in der Niere zwischen Cortex und Medulla unterschieden werden. Die Anzahl der Mikrosphären pro Gewebeprobe gibt Rückschluß auf den regionalen Blutfluß.

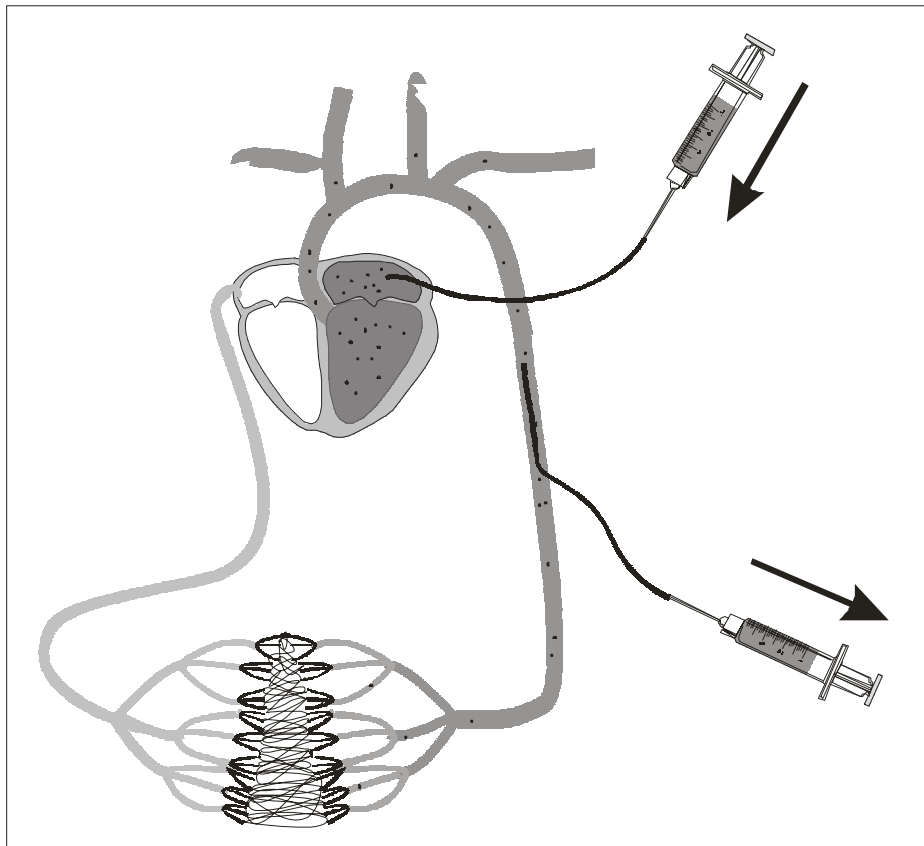


Abbildung 1-1. Mikrosphären werden linksatrial injiziert, mischen sich homogen im Blut und verteilen sich im arteriellen Schenkel des Blutkreislaufes. Dort werden sie aufgrund ihrer Größe präkapillär zurückgehalten. Gleichzeitig mit der Injektion wird aus der Aorta eine Referenzblutprobe zur Quantifizierung des Blutflusses entnommen.

Allerdings werden die Mikrosphären nicht direkt gezählt, sondern man schließt aus der Konzentration des Tracers auf ihre Anzahl zurück. Bei den radioaktiven Mikrosphären misst man die Anzahl der radioaktiven Zerfälle und bei den fluoreszierenden Mikrosphären die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes bzw. dessen Fluoreszenzintensität. Mit Hilfe der arteriellen Referenzprobe kann aus der Anzahl der Mikrosphären der Blutfluß in ml / min / g quantifiziert werden:

$$F_{\text{Org}} = \frac{F_{\text{Art}}}{\text{Int}_{\text{Art}}} \cdot \text{Int}_{\text{Org}} \cdot \frac{1}{m} \quad \text{wobei gilt:}$$

Int_{Org} = Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes in der Organprobe
 Int_{Art} = Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes in der arteriellen Referenzprobe
 F_{art} = Fluß in der arteriellen Referenzprobe
 m = Masse der Gewebeprobe

Zwischen verschiedenen Messzeitpunkten kann unterschieden werden, da zu jedem Zeitpunkt eine Mikrosphärenspezies injiziert wird, die mit einem anderen Tracer beladen ist. Bei den radioaktiven Mikrosphären (RM) sind dies verschiedene Nuklide mit γ -Strahlung unterschiedlicher Spektren. Diese RM wurden 1967 von RUDOLPH und HEYMAN validiert, 1971 von BUCKBERG et al. weiterentwickelt und gelten seitdem als Goldstandard zur Messung der regionalen Organperfusion. Da aber die Verwendung von radioaktiven Nukliden gesundheitliche Gefährdung und hohe Kosten aufgrund der Entsorgung mit sich bringt, versucht man, die Nuklide durch Fluoreszenzfarbstoffe (ABLE and COOPER, 1993) zu ersetzen.

Könnte bei den RM die Zerfallsrate als meßtechnische Größe für die Anzahl der Mikrosphären pro Probe direkt bestimmt werden, so ist es bei fluoreszierenden Mikrosphären (FM) notwendig, diese wieder aus der Organprobe zurückzugewinnen (VAN OOSTERHOUT et al. 1995). Erst dann kann die Fluoreszenzintensität bestimmt werden, welche die Anzahl FM pro Organprobe widerspiegelt. Eine Methode zur Wiederfindung der Mikrosphären, die so genannte Filtrationsmethode, wurde von GLENNY et al. (1993 {2×}, 1995 und 1996) vorgestellt (Abb.1-2).

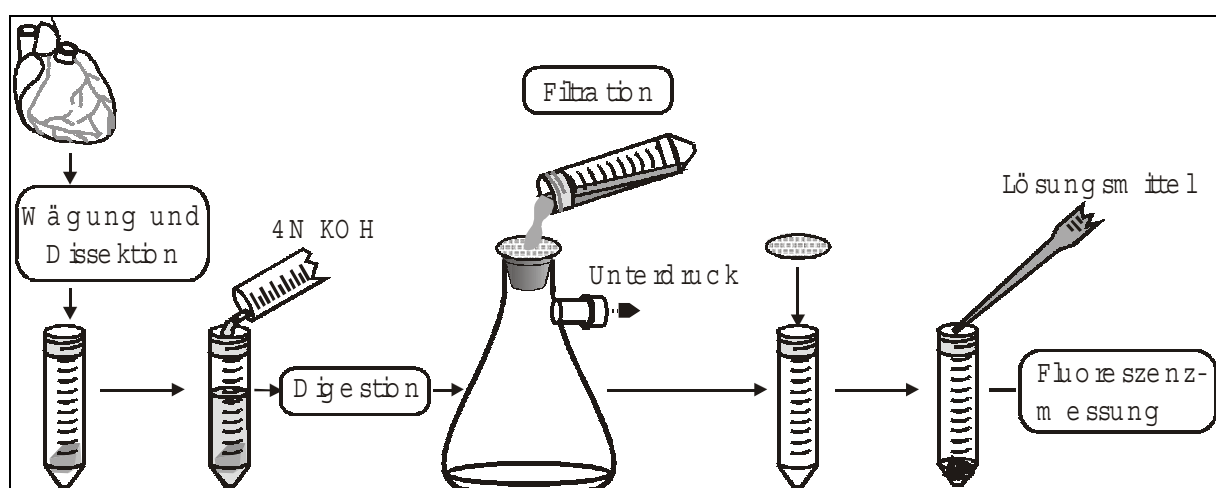


Abbildung 1-2. Filtrationsmethode: Nach Digestion des Organgewebes mittels KOH werden die FM abfiltriert. Der Filter mit den FM wird in ein weiteres Probengefäß gebracht, wo die Auslösung des Farbstoffes erfolgt.

Hierbei werden Organproben in einem Reaktionsgefäß 24 h lang mittels einer 2 M Kalilauge verdaut. Anschließend wird die Flüssigkeit dekantiert und durch eine Polycarbonat-Lochmembran mit einer Porengröße von 7µm filtriert. Hierbei besteht jedoch die Gefahr, daß Flüssigkeit mit Mikrosphären verschüttet wird, oder Mikrosphären an der Wand des Probengefäßes haften bleiben. Der Filter wird - wiederum mit der Gefahr des Mikrosphärenverlustes - in ein weiteres Probengefäß gebracht. Dort wird der Fluoreszenzfarbstoff durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels ausgelöst. Als weiteres Problem dieser Methode erweist sich die lange Digestionszeit, die Zerstörung des PE-Filters durch KOH und ein hoher Arbeits- und Zeitaufwand für das Laborpersonal. Der Vorteil dieser Methode ist der Filtrationsschritt, da hierbei eine komplette Trennung der FM von Digestionsrückständen und KOH erreicht werden kann.

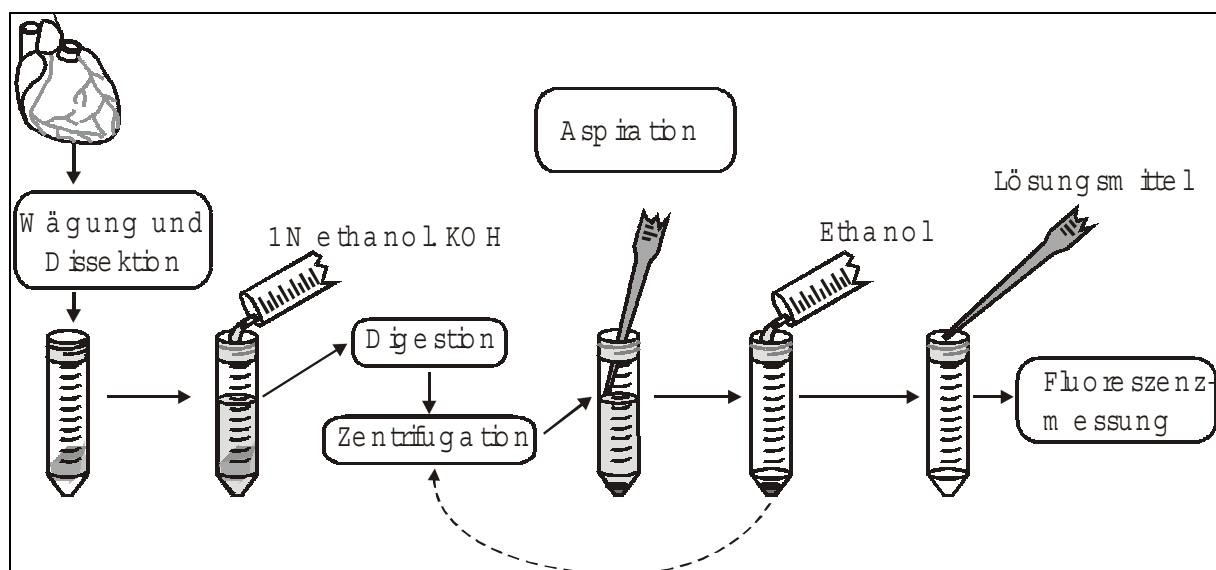


Abbildung 1-3. Sedimentationsmethode: Nach der Digestion des Organgewebes mittels ethanolischer KOH werden die FM wiederholt gewaschen, mittels Zentrifugation sedimentiert und separiert. Das Auslösen des Farbstoffes erfolgt im selben Gefäß.

1995 stellten VAN OOSTERHOUT et al. eine vereinfachte Methode zur Probenverarbeitung, die so genannte Sedimentationsmethode, vor (Abb. 1-3). Zur Digestion der Organproben verwendeten sie eine 1 M ethanolische Kaliumhydroxidlösung. Da diese Flüssigkeit eine geringere Dichte besitzt als die FM, sedimentieren diese. Zur Separation der FM wird die

Digestionslösung in wiederholten Schritten zentrifugiert und abpipettiert und gegen Ethanol ausgetauscht. Dieser Schritt birgt die Gefahr des Verlustes von FM. Die Farbstoffauslösung mit einem organischen Lösungsmittel erfolgt im gleichen Gefäß. Weitere Probleme bei dieser Methode sind die noch längere Digestionszeit (bis 48 h), KOH- und Digestionsrückstände in der Farbstofflösung und wiederum der hohe Arbeits- und Zeitaufwand. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Verwendung eines einzigen Probengefäßes.

Beide Methoden, die bei der Verarbeitung von Gewebeproben verwendet werden, beinhalten also Probleme und Risiken, welche den Verlust von Mikrosphären oder Fluoreszenz zur Folge haben können. Dies kann wiederum zu Meßfehlern führen.

Unsere Aufgabe war es nun, eine neue Methode der Probenverarbeitung zu entwickeln, die notwendigen Arbeitsschritte zu automatisieren und die Validität der Methode im Tierexperiment zu überprüfen.

2 Material und Methodik

2.1 SPU - Sample Processing Unit

GLENNY und VAN OOSTERHOUT haben mit ihren Methoden die Grundlagen zur Verwendung von FM geschaffen. Ziel unserer Studie war es, die Vorteile der beiden etablierten Methoden zu nutzen und ihre Schwächen zu eliminieren. Eine solche neue Methode sollte die Verarbeitung der Proben in einem einzelnen Gefäß erlauben (Sedimentationsmethode) und die Rückgewinnung der Mikrosphären mittels Filtration (Filtrationsmethode) ermöglichen. Dies erfordert die Konstruktion eines neuen Laborgefäßes: der Sample Processing Unit, im folgenden SPU genannt (Abb. 2-1) (RAAB et al., 1999).

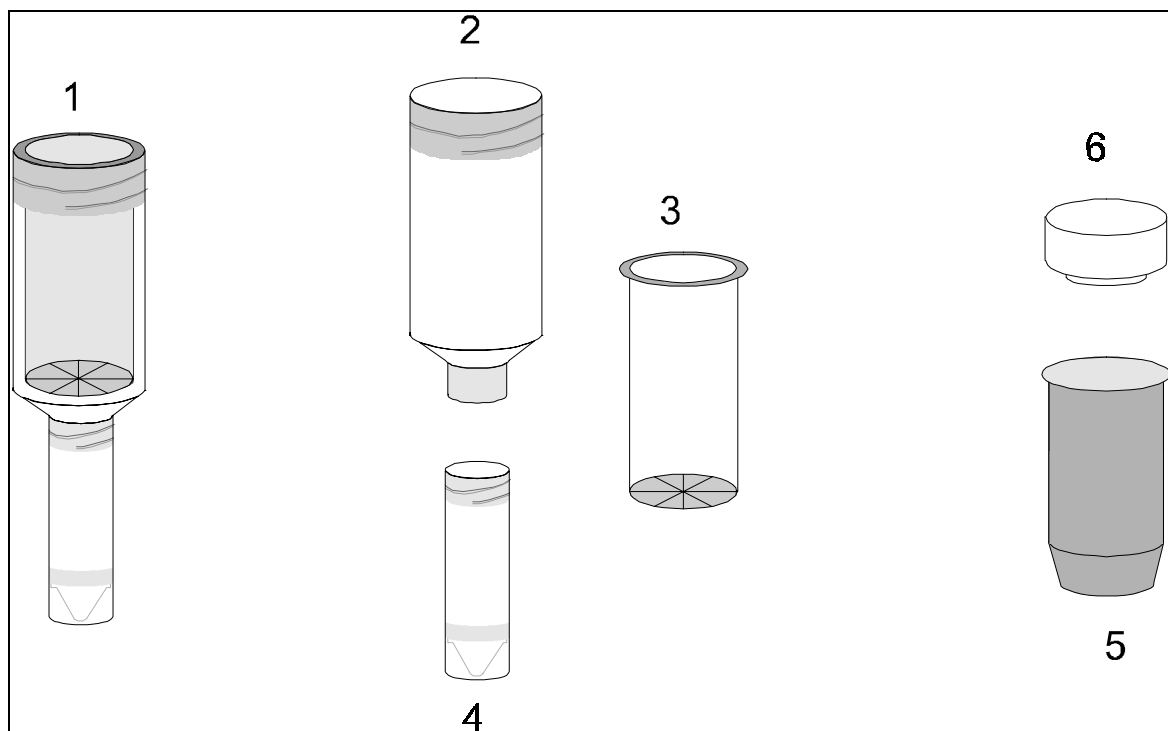


Abbildung 2-1. Gefäße zur Probenverarbeitung: SPU (1) bestehend aus Filterhalter (2), Filter (3) und Probengefäß (4) sowie Kochgefäß (5) mit Deckel (6).

2.1.1 Bestandteile der SPU

Die von uns entwickelte SPU (Gaiser, Kappel-Grafenhausen, Deutschland) besteht aus drei Teilen: Filter, Filterhalter und Probengefäß. Zur Probenverarbeitung wird noch ein zur SPU passendes Kochgefäß mit Deckel benötigt.

Der Filter wird vollständig in den Filterhalter gesteckt. Probengefäß und Filterhalter können miteinander verbunden werden. Dazu kommen noch zwei Schraubdeckel, ein großer für den Filterhalter und ein kleiner für das Probengefäß.

Als Material für die SPU wurde Polypropylen gewählt, da es allen Chemikalien, die während

der verschiedenen Arbeitsschritte der Probenverarbeitung nötig sind, widersteht.

Das Probengefäß (Abb. 2-2) ist ein Zylinder mit einem oberen Durchmesser von 17.0 mm und einer Höhe von 50.0 mm. Somit ergibt sich ein Fassungsvermögen von ca. 4.2 ml. Der Boden ist innwändig kegelförmig gestaltet, um das Abpipettieren von Flüssigkeiten aus dem Gefäß zu erleichtern. Um es senkrecht stellen zu

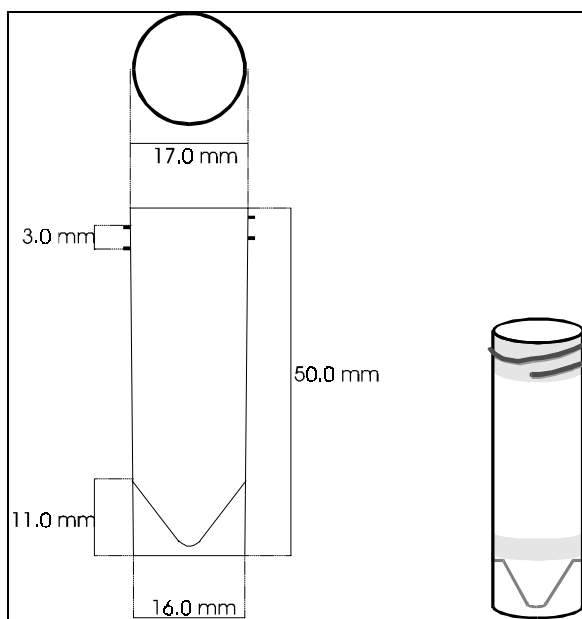


Abbildung 2-2. Probengefäß

können, ist die Wand in Form eines Standrings nach unten hin verlängert. An der Oberseite des Gefäßes ist ein Gewinde mit $1\frac{3}{4}$ Windungen und einer Ganghöhe von 3 mm angebracht, welches den dichten Verschluß des Gefäßes ermöglicht. Der zugehörige Deckel hat eine Höhe von 10 mm und einen Außendurchmesser von 22 mm.

Der Filterhalter (Abb. 2-3) hat eine Gesamthöhe von 77 mm. Sein oberer Außendurchmesser beträgt 29 mm. Es folgt ein 60 mm langer zylinderförmiger Abschnitt, der den Filter aufnehmen kann.

Daran schließt sich ein 6,0 mm langes Reduzierungsstück an, das den Durchmesser auf 16 mm

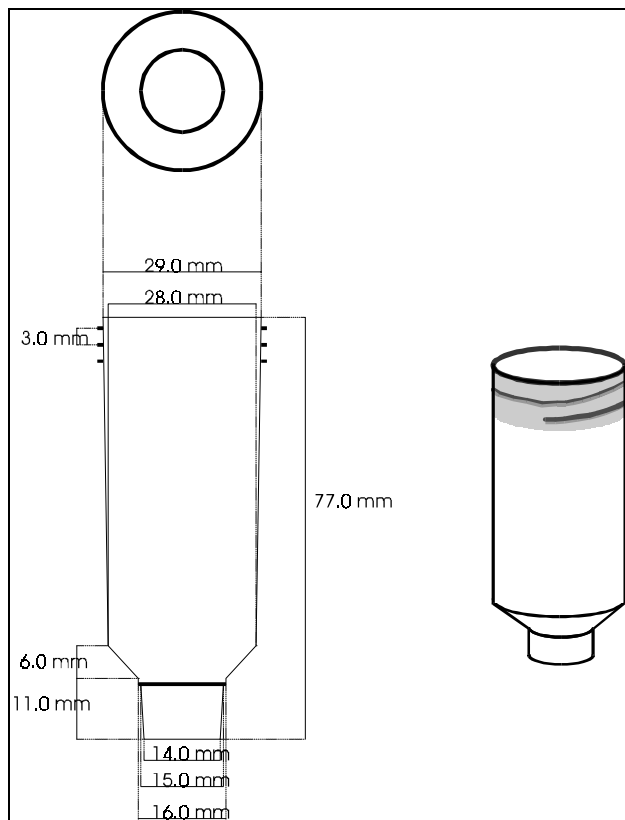


Abbildung 2-3. Filterhalter

verringert. Die untere Öffnung ist als Konus konstruiert, so daß sich sein Durchmesser um zwei Millimeter auf 10,0 mm Länge verringert. Dieser untere Anteil kann in das obere Ende des Probengefäßes gesteckt werden, so daß beide Teile fest miteinander verbunden sind. An der Oberseite des Gefäßes ist wiederum ein Gewinde mit $2\frac{1}{2}$ Windungen und einer Ganghöhe von 3,0 mm angebracht, um das Gefäß luftdicht verschließen zu können. Der zugehörige Deckel hat eine Höhe von 18,0 mm und

einen Außendurchmesser von 33,0 mm.

Den wichtigsten Bestandteil der SPU stellt der Filter dar (Abb. 2-4). Er hat eine Gesamthöhe von 60 mm und einen oberen Durchmesser von 23 mm. Der obere Rand ist mit einem 2,5 mm breiten horizontalen Auflagering ausgestattet, so daß dieser Ring beim Einstecken des Filters in den Filterhalter auf dessen Oberrand zu liegen kommt. Nach unten hin verjüngt sich der Durchmesser kontinuierlich auf 22 mm. Der Boden ist radförmig mit 8 Speichen gestaltet. Auf diesen Stegen kommt das Fil-tergewebe zu liegen. Zur

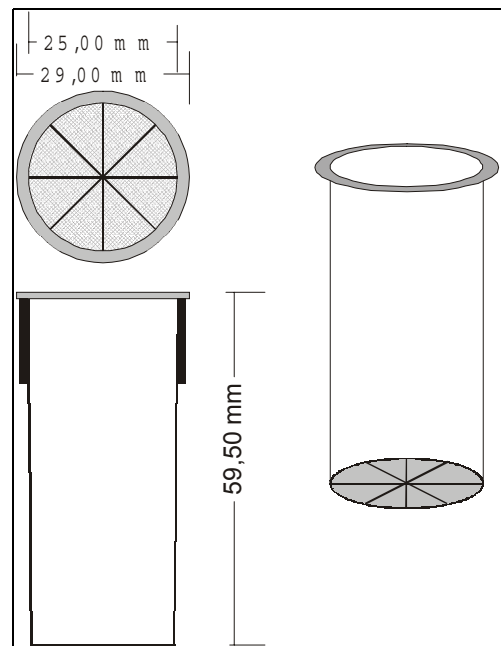


Abbildung 2-4. Filter

Digestion der Gewebeproben werden diese in den Filter eingebracht.

2.1.2 Filtergewebe

Das Filtergewebe (Sefar, Rüslikon, Schweiz) wird aus einem monophilen Polyamid-Faden mit einem Durchmesser von 37 μm hergestellt. Dieser Faden wird unter speziellen Webmustern (Kette und Schuß wechseln sich in einem Muster von 3:1 ab) zu einem Gewebe versponnen. Dadurch erreicht man eine Maschenweite von 7 μm . Die offene Siebfläche, also der Anteil der Fläche, der zur Filtration zur Verfügung steht, beträgt ca. 5%. Die Siebfeinheit, d.h. die Anzahl an Öffnungen pro Strecke, beträgt 275 cm^{-1} .

2.1.3 Kochgefäß

Während der Digestion der Gewebeproben wird der Filter aus dem Filterhalter der SPU entnommen und in ein Edelstahlkochgefäß (Abb. 2-1) eingebracht (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland). Dieses Gefäß ist zylinderförmig, 65 mm hoch und hat einen oberen Durchmesser von 24 mm. Es kann an der Oberseite durch eine Ausbuchtung den oberen Auflagering des Filters aufnehmen. Dies gewährleistet, daß der Filter an allen Seiten inklusivem Boden den gleichen Abstand zum Edelstahlkochgefäß hält. Die unteren 10 mm des Gefäßes sind konisch gehalten und verjüngen sich um 2 mm auf einen unteren Durchmesser von 22 mm, was das Einführen des Kochgefäßes in den später beschriebenen Heizblock erleichtert.

Während der Digestion der Gewebeproben kann das Kochgefäß und der darin befindliche Filter verschlossen werden. Hierzu wurde ein Deckel aus Delrin (Abb. 2-1) entworfen. Dieser Kunststoff zeichnet sich durch seine hervorragende Beständigkeit gegenüber Laugen und einer Vielzahl anderer Chemikalien aus. Seine Gesamthöhe beträgt 15 mm und sein oberer Durchmesser 23 mm. Die zylinderförmige Unterseite des Deckels entspricht dem Innendurchmesser des Filters. Somit ist ein dichter Sitz gewährleistet. Alle Kanten dieses Deckels sind leicht angeschrägt, um ein leichtes Aufsetzen des Deckels auf das Kochgefäß bzw. den Filter zu ermöglichen.

2.2 Verarbeitung von Gewebe- und Referenzblutproben

2.2.1 Verwendete Chemikalien

Für die Verarbeitung der Gewebe- und Referenzblutproben werden für das von uns entwickelte Verarbeitungsprotokoll eine Reihe von Chemikalien verwendet.

Zum Tierversuch muß CPDA-Stabilisator (Apotheke des Klinikums Großhadern, München, Deutschland) (Bestandteile s. Tab. 2.2) für die Entnahme der Blutreferenz und Tween80 - Seifenlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) bereitgehalten werden. CPDA verhindert die Gerinnung des Blutes, indem es Gerinnungsfaktoren blockiert und Blutzellen für einen begrenzten Zeitraum mit Metaboliten versorgt. Desweiteren wird bei der Verarbeitung der Blutprobe eine 0,02 %ige Tween Seifenlösung benötigt, um das Abnahmesystem bestehend aus Spritze und Schlauchsystem zu spülen.

Bei der Verarbeitung der Gewebeproben werden folgende Chemikalien verwendet:

Zur Digestion benötigt man eine 4M Kalilauge, die mit Tween versetzt wird. Hierzu werden 224,6 g KOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml H₂O gelöst und mit 10 ml 2 %iger Tweenlösung gemischt. Ein weiterer Bestandteil der Verdauungslösung ist Isopropanol 100% (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Pro Probe werden 15 ml Digestionslösung und 1,5 ml Isopropanol benötigt.

Für die Reinigung des Filters wird ein Phosphatpuffer verwendet, der aus einem Gemisch aus 2- bzw. 3-wertiger Phosphorsäure besteht. Hierzu werden 29,9 g K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) in 800 ml aqua dest. und 5,88g KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) in 200 ml aqua dest. gemischt und anschließend beide Flüssigkeiten miteinander vermengt. Der entstehende Phosphatpuffer hat den physiologischen pH-Wert von 7,4. Ca. 2 × 20 ml dieser Lösung genügen, um den Filter zu reinigen.

Um den Farbstoff aus den MS zu lösen, sind zwei verschiedene organische Lösungsmittel geeignet. Dies sind 2-Ethoxy-Ethyl-Acetat (Cellosolve®) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis,

MO, USA) und 2-2-Ethoxy-Ethoxy-Ethyl-Acetat (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). 2-2-Ethoxy-Ethoxy-Ethyl-Acetat hat von beiden Flüssigkeiten einen höheren Verdampfungspunkt und ist weniger gesundheitsschädlich. Dagegen kann es nicht für alle Fluoreszenzfarbstoffe, insbesondere nicht für scarlet, eingesetzt werden. Andererseits ist Cellosolve zwar für alle Farben geeignet, aber leichter flüchtig. Dies führt dazu, daß der Farbstoff durch Verdampfung des Lösungsmittels eindickt, die Farbstofflösung also an Fluoreszenzintensität pro Milliliter Flüssigkeit zunimmt.

Farbe	Excitation (nm)	Emission (nm)
blue	356	424
blue-green	427	468
yellow-green	495	505
orange	534	554
red	570	598
crimson	612	638
scarlet	651	680

Tabelle 2-1. Aufgelistet sind die jeweiligen Exzitations- und Emissionsmaxima der verschiedenen FM-Farben. Die Auslösung der Farbstoffe erfolgt mit Cellosolve.

Die beiden Flüssigkeiten dürfen nicht miteinander gemischt werden, da sich in der Mischung keine homogene Farbstofflösung ergibt. Außerdem ist zu beachten, daß die jeweiligen Wellencharakteristika der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe (Exzitations- und Emissionswellenlängen) für die jeweiligen Flüssigkeiten sich jeweils um einige Nanometer unterscheiden. Abb. 2-5. zeigt die Spektren der verwendeten Farben blue, bluegreen, yellowgreen, orange, red, crimson und scarlet. Tab. 2-1. stellt die optimalen Anregungswellenlängen und die Lage der Emissionsmaxima für diese Exzitationswellenlänge dar.

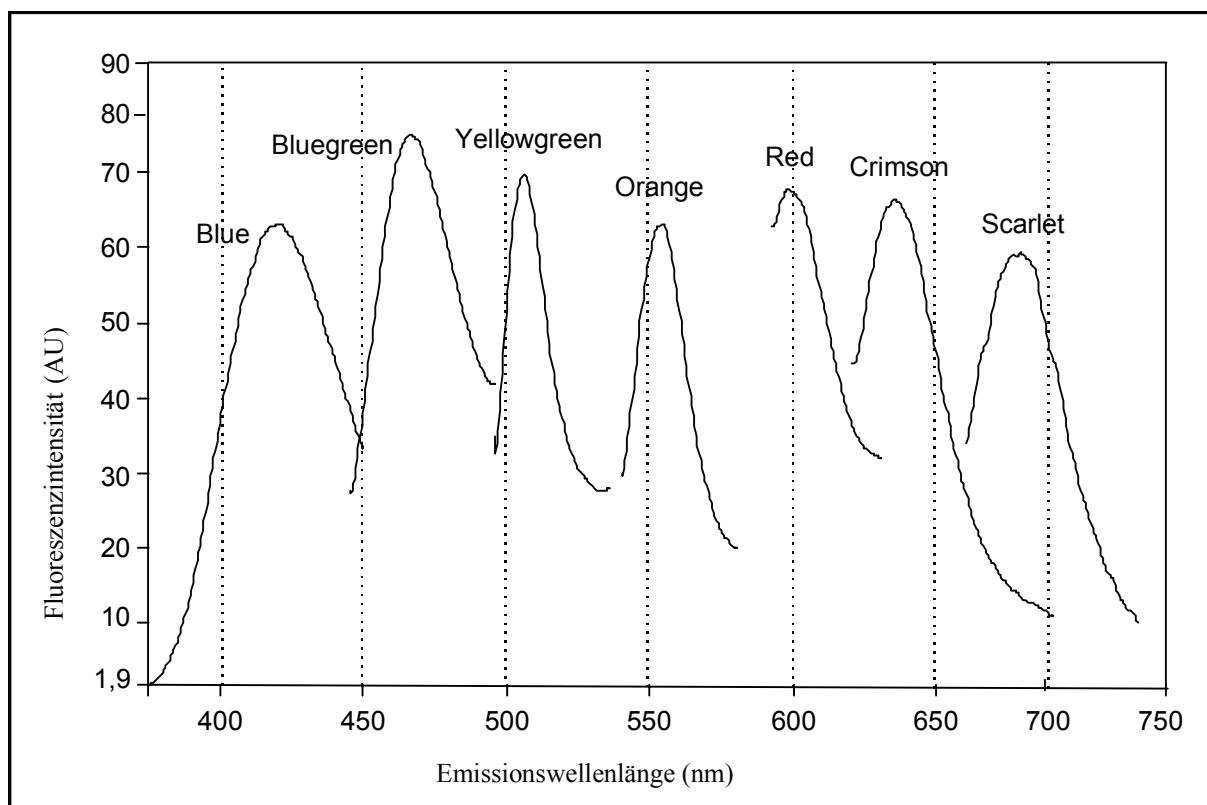


Abbildung 2-5. Emissionsspektren der 7 in unseren Experimenten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

2.2.2 Wägung und Digestion

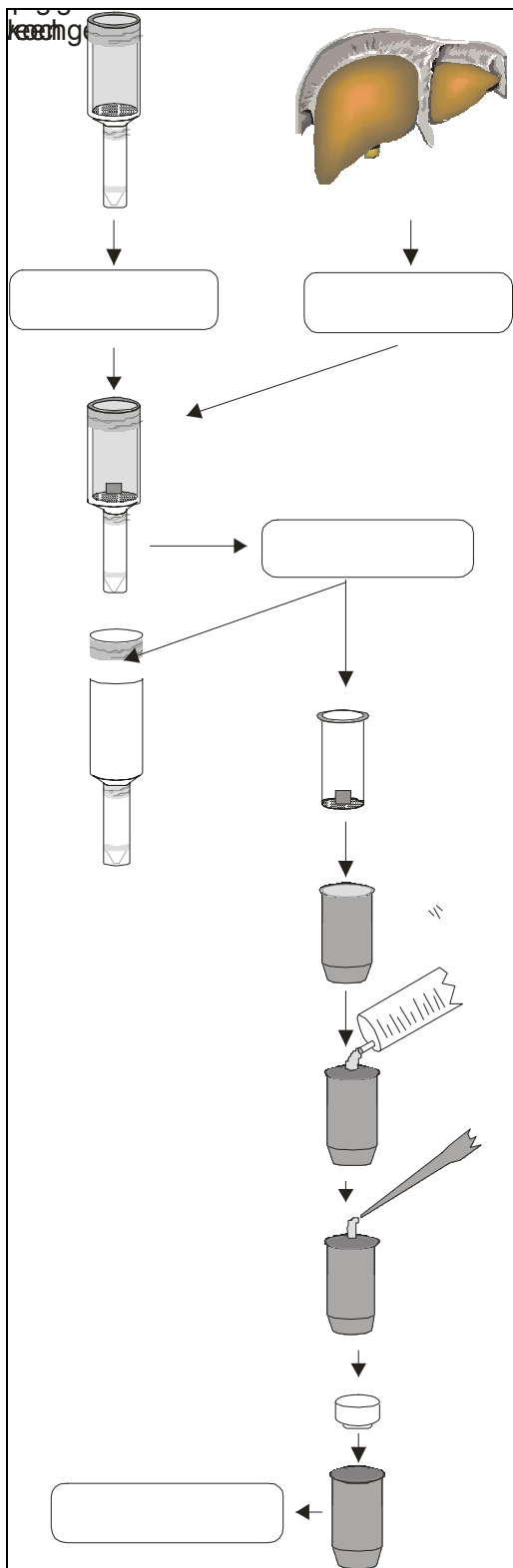


Abbildung 2-6. Nach Dissektion und Wägung der Gewebeprobe wird diese in einen Filter gebracht. Die Digestion dauert bei 60°C mit Hilfe 4N KOH vier bis sechs Stunden.

Nachdem die SPU zusammengesteckt und mit einem Code zur eindeutigen Identifizierung markiert worden ist, wird das Taragewicht der SPU bestimmt. Dann wird die Gewebeprobe in den Filter gelegt und das Probengewicht bestimmt. Der Filter wird der SPU entnommen und in ein Edelstahlkochgefäß gestellt. Zur Verdauung der Probe werden 15 ml Digestionsflüssigkeit (4N KOH mit 0,02 %iger Tween) und 1,5 ml Isopropanol 100 % hinzugegeben.

Das Edelstahlkochgefäß wird nun in einen Heizblock (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) mit 40 dafür vorgesehenen Vertiefungen gestellt. In diesem Heizblock verteilt sich die Hitze von 60°C gleichmäßig auf allen Positionen. Um Verdunstung zu vermeiden, wird das Edelstahlkochgefäß mit dem darin befindlichen Filter mit einem Delrin-Deckel verschlossen. Diese Deckel sind an ihrer Oberseite mit einer Nummer versehen, um eine eindeutige Identifikation der Proben auch im Heizblock zu gewährleisten.

Nach 4 Stunden Inkubation ist das organische Material vollständig aufgelöst und die FM schwimmen aufgrund ihrer Dichte in der Zwischenschicht zwischen KOH und Isopropanol (Abb. 2-7.). Durch

das Detergens Tween© werden die FM in dieser Zwischenschicht zusätzlich zentriert. Dies verhindert die Adhäsion der FM an der Filterwand.

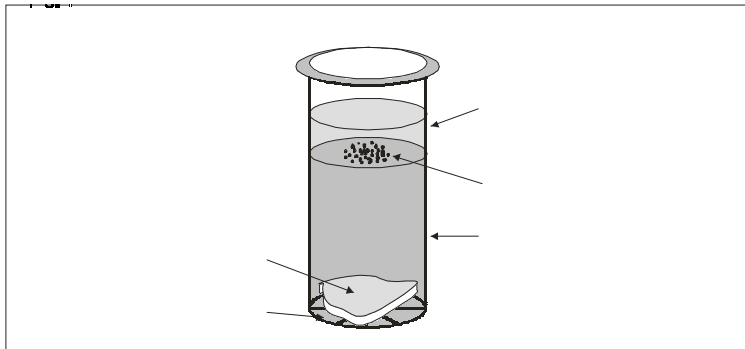


Abbildung 2-7. Dichtegradient aus KOH und Isopropanol. In der Zwischenschicht ordnen sich die aus dem Organewebe freigesetzten FM an.

2.2.3 Filtration und Reinigung

Nach der vollständigen Digestion der Probe wird der Deckel abgenommen und das Edelstahlkochgefäß dem Heizblock entnommen. Der Filter wird aus dem Kochgefäß entfernt und auf etwaige Gewebereste hin überprüft. Es erfolgt nun die Filtration (Abb. 2-8).

Zur Filtration wird der Filter auf die Filterstation gestellt. Diese besteht aus einer Waschflasche, in der Unterdruck erzeugt wird. Der Unterdruck, der notwendig ist, um eine Filtration zu gewährleisten, beträgt ca. 400 hPa. Dies erreichen herkömmliche Unterdruckpumpen oder - wie bei uns - laborinterne Unterdruckleitungen. Die Verwendung einer Wasserstrahlpumpe ist ebenfalls möglich, man muß aber damit rechnen, daß sich dann die Filtrationszeit, die üblicherweise ca. 5 s beträgt, auf 10 s verlängern kann.

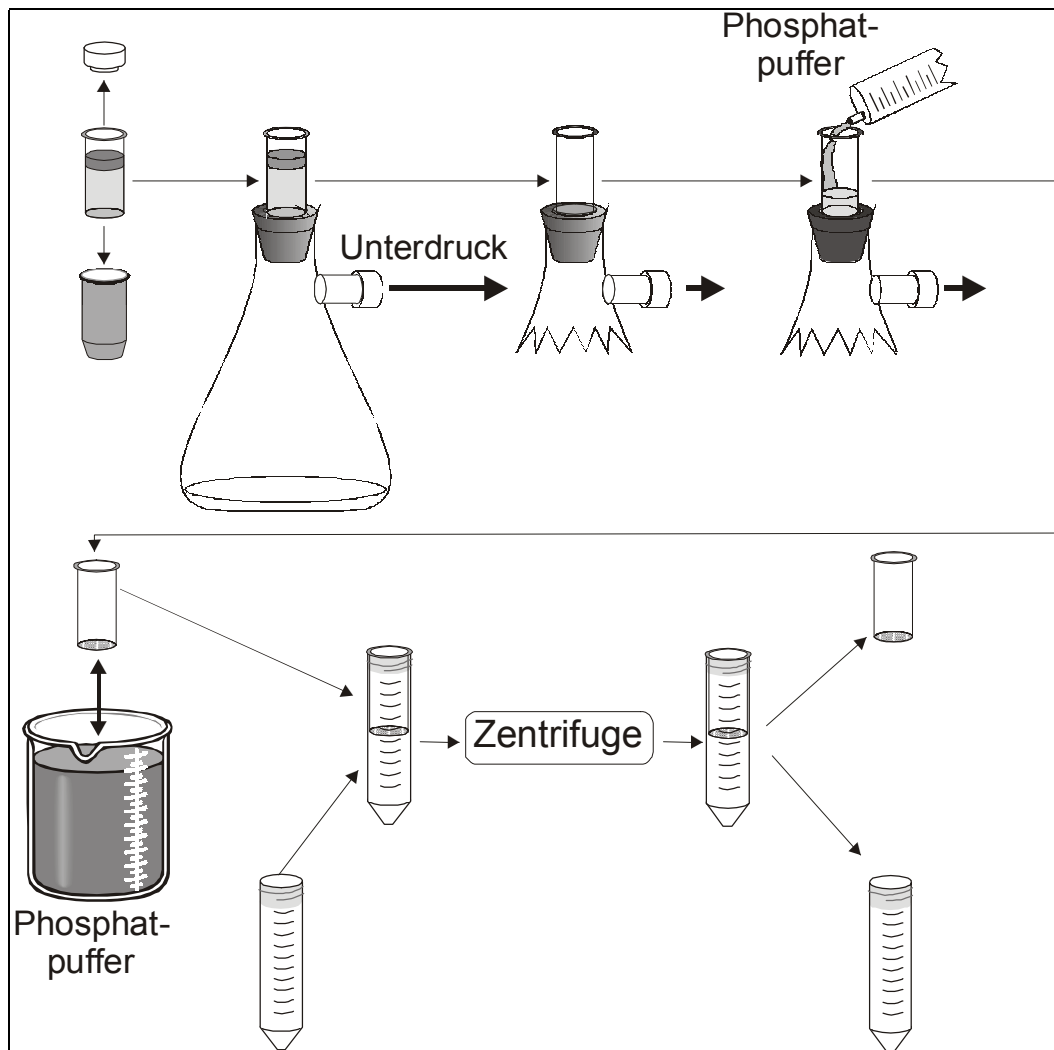


Abbildung 2-8. Nach der Digestion der Gewebeprobe wird die Flüssigkeit filtriert und der Filter anschließend mit Puffer gespült und getrocknet.

Bei der Filtration kommen die FM auf dem Filtergewebe zu liegen. Nun erfolgt die Reinigung des Filters. Zunächst wird der Filter ohne Unterdruck mit 20 ml des Phosphatpuffers (s. 2.2.1.) innwändig gespült. Der mit Flüssigkeit gefüllte Filter wird auf die Saugstation gestellt und mittels Unterdruck geleert. Um auch die Außenfläche von KOH-Rückständen zu befreien, wird der Filter in ein Gefäß mit Puffer eingetaucht. Anschließend wird der Filter in ein 50 ml Reagenzgefäß gestellt und mittels Zentrifugation bei 2000 U/min für 2 min getrocknet. Dieser essentielle Vorgang der Reinigung inklusive Trocknen sollte einmal wiederholt werden.

2.2.4 Farbauslösung

Nach dem Trocknen des Filters wird dieser in die zugehörige Ausgangs-SPU zurückgestellt. Nun wird der Farbstoff mit 2 ml eines organischen Lösungsmittels (2-Ethoxy-ethylacetat, Cellosolve®) aus den FM ausgelöst (Abb. 2-9). Die Menge des Lösungsmittels ist so gewählt,

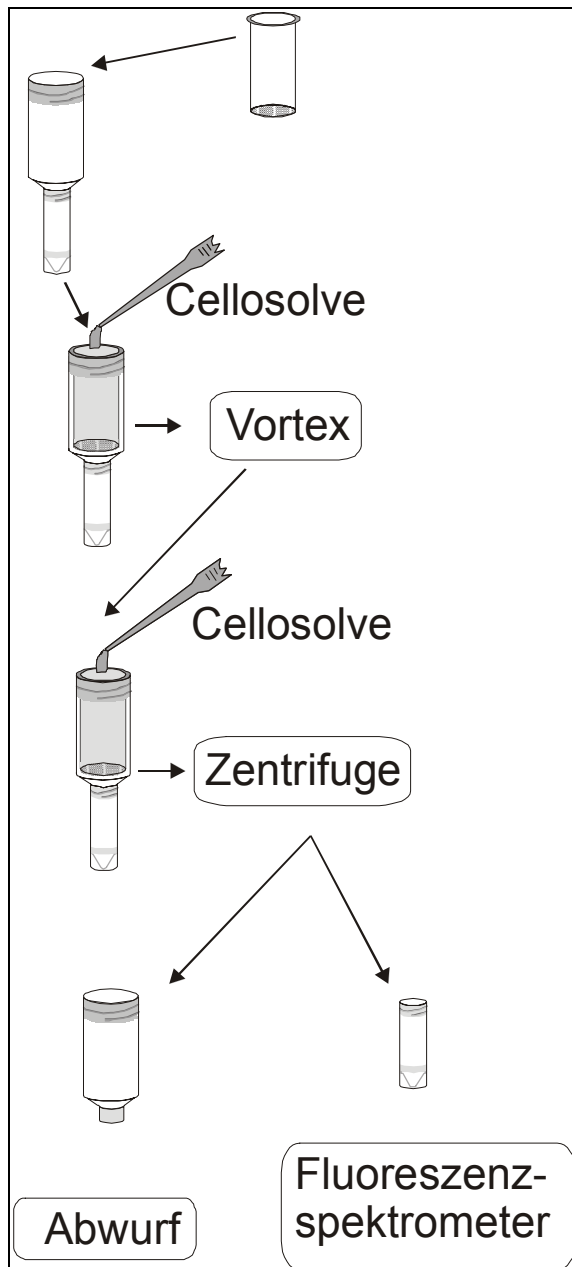


Abbildung 2-9. Farbauslösung durch zweimalige Zugabe von Cellosolve®. Die Lösung wird im Probengefäß aufgefangen. Es folgt die Messung der Fluoreszenzintensität.

daß für eine Anzahl von 100 bis 2000 FM eine Farbstoffkonzentration entsteht, die mit einem Fluoreszenzspektrophotometer in einem sinnvollen Meßbereich gemessen werden kann. Weder besteht die Gefahr, daß die Empfindlichkeit des Gerätes für die Fluoreszenzintensität zu gering ist, noch wird der Photomultiplier überladen. Unsere Durchflußküvette und Schlauchsystem für das Fluoreszenzspektrometer benötigt 500 µl, so daß die Farbstofflösung (2 ml) bei Bedarf viermal gemessen werden könnte. Eine wiederholte Messung dient der Qualitätskontrolle der Messung.

Die Zugabe des Lösungsmittels erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird 1 ml zupipettiert, der den Farbstoff aus den FM herauslöst. Dieser Vorgang dauert ca. 30 s und wird durch sanftes Vortexen unterstützt. Die Zugabe des zweiten Milliliters Lösungsmittel spült den Fluoreszenzfarbstoff durch das Filtergewebe.

Durch Zentrifugation (2000 U/min für 2 min) wird der Farbstoff im Sammelgefäß aufgefangen. Nun wird der Oberteil der SPU (Filterhalter und Filter) abgetrennt und entsorgt. Das Sammelgefäß wird mit dem Schraubverschluß verschlossen und an einem lichtgeschützten Ort bei Zimmertemperatur bis zur Messung der Fluoreszenz aufbewahrt.

2.3 Variation des Protokolls für verschiedene Organgewebe

Das unter 2.2 beschriebene Standardprotokoll ist geeignet für Gewebeproben der Organe Herz, Niere, Milz, Bauchspeicheldrüse, Magen, Darm und Muskel. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Gewebe mit Formalin fixiert ist oder nicht. Lediglich das Gewicht der einzelnen Proben sollte 4 g nicht überschreiten. Bei schwereren Gewebestücken (bis zu 7 g große Stücke wurden verarbeitet) muß wegen des begrenzten Fassungsvermögen des Filters die Menge der Digestionslösung dem „Probenübergewicht“ entsprechend (1 ml Flüssigkeit pro 1 g Gewebe über 4 g Gesamtgewicht) vermindert werden. In diesem Fall sollte aber auch die Molarität der Kalilauge auf 6 M erhöht werden und die Digestionszeit auf 6 bis 7 h verlängert werden.

Üblicherweise reicht die Menge von 1,5 ml Isopropanol aus. Werden aber Organgewebe verarbeitet, die einen hohen Fett- oder Kollagenanteil (z.B. neurales Gewebe, Leber oder Haut) besitzen, so sollte die Alkohol-Menge auf Kosten der Kalilauge auf 2,5 ml erhöht werden. Dies ermöglicht es, den höheren Lipidanteil zu lösen.

Knochengewebe besteht aus einer organischen und einer kristallinen Matrix. Letztere ist resistent gegenüber Laugen. Deshalb muß diese zuerst mittels einer Säure aufgelöst werden. Hierzu eignet sich 1 N Salzsäure.

Zunächst wird der Knochen gespalten und das Knochenmark entfernt. Dieses kann direkt ohne Fixation nach dem Standardverfahren verarbeitet werden. Dann wird das Probengewicht des nativen Knochens bestimmt. Dieser wird nun in ein 50 ml Reagenzgefäß aus Polypropylen gelegt, vollständig mit 1 N HCl (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) überschichtet und

verbleibt dort je nach Knochendicke 3 bis 7 Tage. Beim anorganischen Knochenmaterial handelt es sich überwiegend um Calciumcarbonat-Kristalle, die mit Salzsäure zu CO_2 und löslichen Salzen zerfallen. Deshalb darf das Gefäß nicht vollständig verschlossen werden, damit das Kohlendioxid entweichen kann. Die verbliebene organische Matrix ist nun weich und biegsam. Um Salzsäurereste zu neutralisieren, wird das Gewebe kurz in den Phosphatpuffer eingetaucht. Die Weiterverarbeitung dieser Gewebeproben findet in der SPU nach dem unter 2.2. beschriebenen Standardverfahren statt.

Die Verarbeitung von nicht geblähter, fixierter Lunge kann nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt werden. Oft ist es jedoch notwendig, die Lunge zu blähen und zu trocknen, was eine spätere exakte Dissektion ermöglicht. Dadurch wird allerdings das spezifische Gewicht der Lunge niedriger als das von Isopropanol und das Gewebe schwimmt auf der Digestionslösung auf. Eine Digestion ist aufgrund des fehlenden KOH-Kontaktes unmöglich. Deshalb wird für dieses leicht verdaubare Gewebe eine 1N ethanolische KOH verwendet, die nicht zusätzlich mit Isopropanol überschichtet wird. Diese ethanolische Lauge besitzt eine geringere spezifische Dichte als das getrocknete Lungengewebe und die darin enthaltenen FM, weshalb die Lunge vollständig eintaucht und die FM sedimentieren. Außer der Verwendung einer modifizierten KOH-Lösung erfolgt die Verarbeitung wie oben beschrieben. Hierbei reicht auch eine dreistündige Digestionszeit aus. Die ethanolische KOH ist allerdings extrem flüchtig, weshalb das Kochgefäß dicht verschlossen werden muß.

2.4 Verarbeitung der Blutprobe

Zur Quantifizierung des Blutflusses wird, wie unter 2.10. beschrieben, eine arterielle Referenzblutprobe gewonnen. Aus der Blutprobe müssen die FM vollständig wiedergewonnen werden. Mit der SPU ist es erstmals möglich, Blut direkt zu filtrieren und damit eine vollständige Wiederfindung der FM aus der Referenzblutprobe zu ermöglichen. Die

Blutabnahme erfolgt mit Hilfe von Schläuchen, die vollständig mit CPDA (Tab. 2-2) gefüllt sind. Insgesamt sind 4 ml CPDA pro 100 ml Blut notwendig. Nach der Abnahme sollte die Blutprobe dann innerhalb von 24 h filtriert werden. Mit einer 0,3 %igen Tween-Lösung werden die Schläuche und Spritzen, mit denen das Blut entnommen wurde, gespült. Tween als Detergens vermag an den Wänden der Plastikteile anhaftende FM abzulösen. Auch diese Spüllösung wird durch den Filter der jeweiligen Blutreferenz filtriert. Diese Vorgehensweise schließt den Verlust von FM aus der Referenzprobe aus.

Anschließend durchlaufen die Filter das gesamte Protokoll. Dadurch werden die in den Filtern zurückgehaltenen Blutbestandteile, wie z.B. Leukozyten zerstört.

Bestandteil	Menge (g)
Na-Citrat-Dihydrat	26,3
Citronensäure-Monohydrat	3,27
Glucose-Monohydrat	31,9
Na-Dihydrogen-Dihydrat	2,51
Adenin	0,275

Tabelle 2-2. CPDA-Stabilisator nach DAB (ad 1000 ml Aqua ad inject.), (Apotheke des Klinikum Großhadern, München, Deutschland)

2.5 Bestimmung der Farbkonzentration

2.5.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein physikalisches Phänomen, bei dem Photonen einer bestimmten Wellenlänge auf Elektronen eines Atoms treffen und diese auf ein höheres Energieniveau heben. Die für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifische Anregungs-Wellenlänge nennt man Exzitationswellenlänge. Nach kurzer Zeit fällt nun das angeregte Elektron wieder auf sein stabileres Ausgangsenergieniveau zurück. Dabei sendet es wiederum ein Photon aus, welches aber langwelliger ist als das Anregungsphoton (zweiter Hauptsatz der Wärmelehre). Die Wellenlänge dieses Lichtes nennt man Emissionswellenlänge. Diese ist wiederum für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifisch. Die Differenz der Wellenlängen von Exzitation und Emission

wird Stokes Shift genannt. Idealerweise wird jeder Fluoreszenzfarbstoff nur von einem sehr engen Lichtspektrum angeregt und emittiert auch wiederum nur ein sehr schmales Spektrum. Dies ist bei den für die FM verwendeten Farbstoffen der Fall (Abb. 2.5).

Aus diesen physikalischen Bedingungen ergeben sich nun einige wichtige Aspekte, die bei der Messung von Fluoreszenzfarbstoffen zu beachten sind.

Ein unangenehmer Effekt kann das Überlappen von Spektren verschiedener Farben sein. Ziel ist es, jede Farbe für sich alleine zu messen. Die Spektralmaxima der verwendeten Farben (blue, bluegreen, yellowgreen, orange, red, crimson und scarlet) sind auch genügend weit voneinander entfernt. Lediglich für red gibt es einen geringen Wellenlängenbereich, der auch von crimson belegt wird, sodaß sich die Spektralkurven beider Farben überlappen. Dieser sogenannte Spillover-Effekt bedeutet, daß die Farbe crimson wegen des red-Überhanges überschätzt wird. Diese Überschätzung wird mit 6 % angegeben (GLENNY, 1993). Früher hatte der Hersteller der verwendeten FM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) noch die Farbe green im Programm, welche diesen Effekt sehr stark zeigte. Um diesen Effekt zu eliminieren, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen die rechnerische Elimination, welche am Beispiel für red und crimson erklärt wird: Die Anregungswellenlänge für red regt gleichzeitig auch crimson an, und ein geringer aber konstanter Prozentsatz des crimson-Spektrums wird auch bei red mitgemessen. Nun müssen die Höhe des crimson-Maximums und dessen Anteil am red-Maximum bestimmt werden. Dieser Anteil muß durch eine Reihe von Vergleichsmessungen experimentell ermittelt werden. Die Höhe des crimson-Maximums kann gemessen werden und hierbei kann die Farbe red nicht als Störfaktor gelten, da - wie bereits oben angemerkt wurde - ein Fluoreszenzfarbstoff nur durch Licht höherer Energie angeregt werden kann.

Eine andere Möglichkeit, diesen Effekt zu vermeiden ist die Anregung überlappender Spektren mit einer geringen Verschiebung der Exzitationswellenlänge in Richtung des blauen Endes des

Farbspektrums. Somit ist die Gefahr geringer eine Farbe am entfernteren roten Ende der Farbskala mitanzuregen.

Bei den von uns verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen spielen diese Überlegungen noch keine große Rolle, da der Überlappungseffekt, sofern überhaupt vorhanden, nur sehr gering ausgeprägt ist. Allerdings dürften bei späteren, neuen Farbstoffen (eine Verdopplung der Anzahl ist geplant) diese Mechanismen eine größere Rolle spielen.

2.5.2 LS50B

Der prinzipielle Aufbau eines Fluoreszenzphotometers ist in Abb. 2-10. gezeigt. Die Lichtquelle ist eine Xenonlampe, die pulsatil ein kontinuierliches Spektrum von 200 bis 900 nm aussendet. Um nun die spezifische Exzitationswellenlänge aus dem kontinuierlichen Farbspektrum herauszufiltern, passiert das Licht zuerst einen Monochromator. Als nächstes liegt im Strahlengang ein Schlitz, der die Lichtintensität regelt. Nun trifft das Anregungslicht auf die Küvette mit der darin befindlichen Flüssigkeit. Im rechten Winkel zum

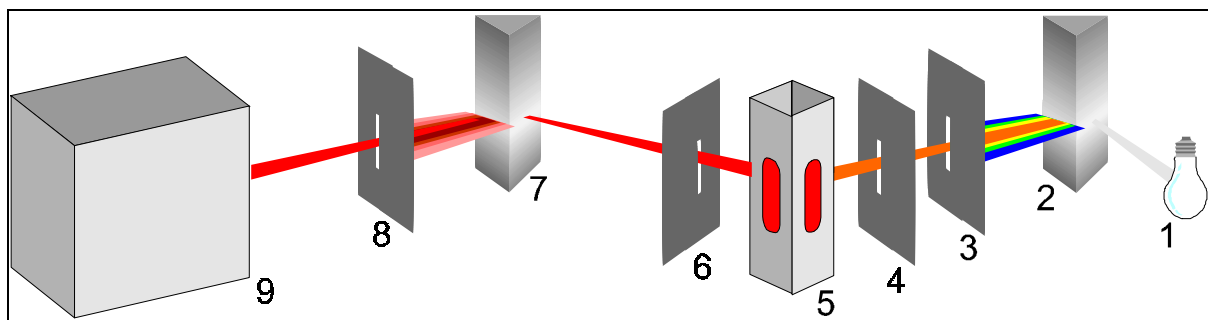


Abbildung 2-10. Die Wellenlänge des Lichtstrahls von der Xenonlampe (1) wird im Monochromator (2, Prisma und 3, Spalt) eingestellt. Der Exzitationsspalt (4) stellt die Lichtintensität für die Probe in der Küvette (5) ein. Das im 90° Winkel abgestrahlte Fluoreszenzlicht wird in der Intensität (6, Spalt) und Wellenlänge (7, Prisma und 8, Spalt) eingestellt. Nachgeschaltet sind Photomultiplier und Detektor (9).

Exzitationsstrahlengang liegt nun der Emissionstrahlengang. Diese Anordnung soll verhindern, daß einfallendes Anregungslicht die Analyse des Emissionslichtes behindert. Im Emissionstrahlengang kann wiederum die Lichtintensität durch Einstellung der Schlitzweite reguliert werden. Auch im Emissionsstrahlengang befindet sich ein Monochromator, der die

Spektralanalyse des Lichtes erlaubt. Zur Verstärkung der Lichtintensität ist vor den Detektor noch ein Photomultiplier geschaltet.

Diese Anordnung erlaubt einige Einstellungen, die über die mit dem Fluoreszenzspektrophotometer LS50B (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) mitgelieferte Software FIWinLab vorgenommen werden können. An der Entwicklung dieses Programmes waren wir beteiligt.

Über die beiden Monochromatoren können grundsätzlich drei verschiedene Scanmodi durchgeführt werden. Der Exzitationsscan, mit dem z. B. die optimale Anregungswellenlänge gefunden werden kann, der Synchronscan, der für unsere Anwendung eine eher untergeordnete Bedeutung hat, und der Emissionsscan, mit dem das jeweilige Maximum des Emissionsspektrums gefunden werden kann. Dieser letzte Scanmodus wird bei der Messung der Fluoreszenzintensität hauptsächlich verwendet. Hierbei wird ein vorher eingestelltes Band gescannt und die Software bestimmt selbständig das Maximum des resultierenden Spektrums. Dieses Maximum korreliert mit der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes.

Der Photomultiplier hat ein oberes Maximum, bis zu dem er linear verstärkt. Wird dieser Bereich überschritten, ist also die Lichtintensität zu stark, wäre die Messung nicht mehr zu verwerten. Dieses Problem kann man umgehen, indem man die Schlitzweite im Emissionstrahlengang enger stellt. Bei der Messung der Fluoreszenzintensität von ca. 200 bis 2000 FM haben sich Schlitzweiten zwischen 4 und 8 nm als günstig erwiesen.

2.6 Automatisierung der Methode

2.6.1 Roboter

2.6.1.1 Bestandteile

In den vorherigen Kapiteln wurde die Methode beschrieben, mit der Gewebeproben von Hand verarbeitet werden können. Hierbei entsteht ein nicht unerheblicher Arbeitsaufwand. Ziel der Arbeit war es, neben der Validierung der von uns entwickelten Methode zur Probenverarbeitung auch eine konkurrenzfähige Alternative zu den radioaktiven Mikrosphären

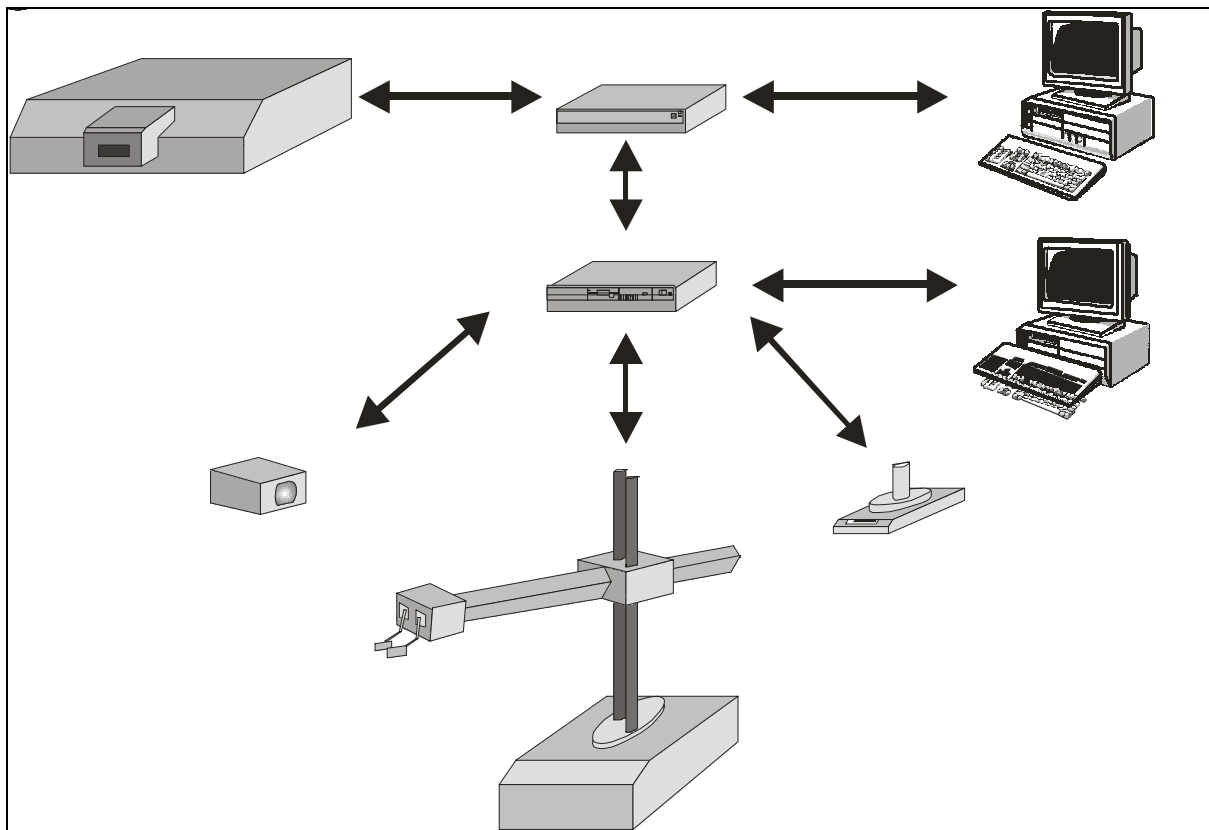


Abbildung 2-11. Der Controller (2) des Roboters erhält seine Befehle von einem PC. Daran sind Ausgabe- (Roboter, 3) und Eingabegeräte (Barcodeleser, 4 und Waage, 5) angeschlossen. Es besteht eine bidirektionale Verbindung zum Meßgerät (Controller, 6, PC, 7 und LS50B, 8).

zu finden. Bei diesen Methoden muß dank einer automatisierten Probenauswertung nur die Dissektion und Wägung der Proben manuell erfolgen (SCHOSSER et al. 1979).

Bei der Verarbeitung von Proben mit FM bedarf es aufgrund der vielen unterschiedlichen Abläufe eines Roboters zur Automatisierung. Dabei fiel die Wahl auf einen Laborroboter der Firma Zymark (Idstein, Deutschland). Dieses System (Abb. 2-11 und 2-12) besteht aus einer Zentraleinheit, die in drei Achsen beweglich ist. Am Arm dieses Zentralroboters ist eine Hand befestigt, die wiederum zwei freie Achsen zur Bewegung hat. Um diesen zentralen Roboter sind modular die einzelnen Stationen zirkulär angeordnet. Diese kann dann der Roboter jeweils mit seiner Hand erreichen. Die einzelnen Stationen sind teils von den einzelnen Firmen (Tab. 2-3) erworben oder am Institut für Chirurgische Forschung (ICF) von unserer Arbeitsgruppe selbst entwickelt und angefertigt.

In Tab. 2-3 sind die Stationen in der Reihenfolge des Probenablaufes kurz beschrieben. Für eine ausführlichere Darstellung sei hier auf die Dissertation von Herrn Dr. E. Thein verwiesen, dessen Arbeit die Automatisierung der Methode (THEIN et al., 2000) zum Inhalt hat.



Abbildung 2-12: Robotersystem mit zentraler Robotereinheit (1), Heizblock (2), Trenn- und Spülstation (3), Pipettierstation (4), SPU racks (5), Deckelspender (6), Trenn- und Verschraubstation (7), AS90 / LS50B (8), Zentrifuge (9), Waage (10), Barcode Leser (11).

Station	Ablauf	Herstellung
Parkstation Hand	Zentralroboter holt Hand	Zymark
SPU rack	Deckel wird von SPU abgenommen	ICF
Deckelablage	Deckel wird abgelegt	ICF
SPU rack	SPU wird abgeholt	ICF
Barcode Leser	Barcode der SPU wird gelesen	Data logic
Waage	Probengewicht wird bestimmt	Mettler
Trenn- und Spülstation	Filter wird aus SPU genommen	ICF/Festo
SPU rack	leere SPU wird zurückgestellt	ICF
Heizblock	Kochgefäß wird entnommen	Perkin Elmer
Trenn- und Spülstation	Filter wird in Kochgefäß gestellt	ICF/Festo
Pipettierstation	Digestionslösung wird zugegeben	ICF/Zymark
Heizblock	Kochgefäß mit Filter wird zurückgestellt	Perkin Elmer
Deckelablage	Deckel wird abgeholt	ICF
Heizblock	Deckel wird auf Kochgefäß gelegt	Perkin Elmer
Heizblock	Digestionszeit 6h	Perkin Elmer
Heizblock	Deckel wird abgeholt	Perkin Elmer
Deckelabwurf	Deckel wird verworfen	ICF
Heizblock	Kochgefäß mit Filter wird abgeholt	Perkin Elmer
Trenn- und Spülstation	Filter wird dem Kochgefäß entnommen	ICF/Festo
Pipettierstation	Kochgefäß wird leergesaugt	ICF
Heizblock	Kochgefäß wird zurückgestellt	Perkin Elmer
Trenn- und Spülstation	Digestat wird filtriert	ICF/Festo
Trenn- und Spülstation	Filter wird innen und außen gereinigt	ICF/Festo
Ausgleichsrack	Trocknungs-SPU wird geholt	ICF
Trenn- und Spülstation	Filter wird in Trocknungs-SPU gestellt	ICF/Festo
Waage	Gewicht wird bestimmt	Mettler
	Ausgleichs-SPU wird gegen	
Zentrifuge	Trocknungs-SPU ausgetauscht	ICF/Zymark
Zentrifuge	Filter wird getrocknet	ICF/Zymark
	Trocknungs-SPU wird gegen	
Zentrifuge	Ausgleichs-SPU ausgetauscht	Zymark
Trenn- und Spülstation	Filter wird aus Trocknungs-SPU genommen	ICF/Festo
Ausgleichsrack	Trocknungs-SPU wird zurückgestellt	ICF
SPU rack	SPU wird abgeholt	ICF
Trenn- und Spülstation	Filter wird in SPU gesteckt	ICF/Festo
Pipettierstation	1 ml Cellosolve wird zupipettiert	ICF/Zymark
Vortex	Schütteln der SPU für 30 sec.	Zymark
Pipettierstation	1 ml Cellosolve wird zupipettiert	ICF/Zymark
Vortex	Schütteln der SPU für 30 sec.	Zymark
Zentrifuge	Auffangen der Farbe im Sammelgefäß	Zymark
Trenn- und Verschraubstation	Sammelgefäß wird abgetrennt	Zymark
AS 90 / LS 50B	Bestimmung der Fluoreszenzkonzentration	ICF/Perkin Elmer
Abwurf	Abwurf des Filters und des Filterhalters	ICF
Trenn- und Verschraubstation	Sammelgefäß wird abgestellt	Zymark
Deckelspender	Deckel wird abgeholt	Zymark
Trenn- und Verschraubstation	Sammelgefäß wird verschraubt	Zymark
Abwurf	Abwurf des Sammelgefäßes	ICF
Parkstation Hand	Hand wird zurückgestellt	Zymark

Tabelle 2-3. Ablauf der Probenverarbeitung im Roboter.

2.6.1.2 Software

Ein Laborroboter zur automatischen Probenverarbeitung sollte folgende Merkmale aufweisen:

1. hoher Probendurchsatz
2. geringer Nutzeraufwand
3. selbständiges Erkennen von Fehlern
4. selbständiges Lösen von Problemen

Die zum Betrieb des Roboters notwendige Software wurde von uns entworfen und an das Verarbeitungsprotokoll angepasst. Ein hoher Probendurchsatz wird durch möglichst geringe Standzeiten des Roboters gewährleistet. Die hier vorliegende Programmstruktur erlaubt diese Optimierung. Ein so genannter Scheduler verwaltet die jeweiligen Programmuntergruppen. Diese werden Luos genannt und werden einer Pipeline-Struktur ähnlich nacheinander aufgerufen. Dies bedeutet, daß alle 12,5 min (Gesamtdauer aller 8 Luos) eine Probe dem Verarbeitungsprozeß zugeführt wird und jede in Bearbeitung befindliche Probe vom nächst höheren Luo bearbeitet wird. Dabei fällt dann die Probe, die zuletzt im achten Luo war aus dem Bearbeitungszyklus heraus. Die Priorität unter den Luos ist so definiert, daß alle 12,5 min jedes Luo ausgeführt wird. Somit wird immer das Luo - meist das mit der höchsten Nummer - ausgeführt, dessen letzter Aufruf am längsten zurückliegt. Dies gewährleistet, daß bei einem Stopp der Probenverarbeitung zwar im Prozeß befindliche Proben vorrangig verarbeitet, aber dennoch die unteren Luos wiederaufgefüllt werden. Unnötige Ruhezeiten des Roboters werden dadurch verhindert und ein hoher Probendurchsatz erreicht.

Der Roboter ist so programmiert, daß er - einmal gestartet - unendlich viele Proben in einem Durchlauf verarbeiten kann. Jedoch müssen Verbrauchsmaterial und SPUs mit Gewebeproben nachgefüllt sowie die Abfallbehälter geleert werden. Momentan ist das limitierende Element die Menge der SPU-Positionen in den Eingangsracks, welche maximal $4 \times 40 = 160$ Proben aufnehmen können. Somit müssen spätestens nach 32 Stunden die Eingangsracks mit SPUs

neu bestückt werden. Zu diesem Zeitpunkt werden auch sämtliche Verbrauchsmaterialien (Chemikalien, Deckel usw.) aufgefüllt und die Abwürfe geleert.

Der Roboter ist so programmiert, daß er Fehler selbständig erkennen kann. Fehler können u.a. bei der Trennung der SPU auftreten. In diesem Fall würde der Filterhalter nicht vom Sammelgefäß abgenommen und der Fluoreszenzfarbstoff könnte im nächsten Schritt nicht aspiriert werden. Deswegen prüft die Roboterhand mit einem Griff 2 cm oberhalb des Sammelgefäßes, ob der Filterhalter noch auf dem Sammelgefäß steckt. Ist dies der Fall, kann die Roboterhand nicht vollständig geschlossen werden. Dies wird über eine rückkoppelnde Sensorik gemeldet und der Trennvorgang wird erneut initiiert.

Eine weitere Fehlermöglichkeit besteht darin, daß unverdaute Proben in den Filtrationsprozeß eingehen. Bei der manuellen Verarbeitung würden solche Proben auffallen. Der Roboter ist nicht zu einer visuellen Überprüfung in der Lage. Deswegen wird jede SPU nach der Filtration gewogen. Weicht dieses Gewicht um mehr als 1,5 g vom durchschnittlichen SPU-Gewicht ab, so wird diese Probe in das Eingangsrack zurückgestellt und als Fehlerprobe nicht mehr weiterverarbeitet. Bei der nächsten Überprüfung des Roboters wird diese Probe dann entnommen und kann entweder erneut in den Verarbeitungsprozeß eingehen oder wird manuell weiterverarbeitet. Auf diese Weise wird sowohl der Roboter vor Beschädigung (Unwucht der Zentrifuge bei voller SPU) geschützt als auch der Verlust von Proben vermieden.

Diese Eigenüberprüfung des Roboters findet kontinuierlich statt. Dies ist wichtig bei zufälligen Fehlern. Geht z.B. eine Probe durch fehlerhaftes Abstellen verloren, kann der Roboter diese beim Wiederaufnehmen nicht finden. Er meldet dann, daß er die Probe nicht gefunden hat und gibt Hinweise auf die Lösung des Problems, hier z.B. das Zurückstellen der Probe. Nach Tastenbestätigung wird der letzte Programmschritt wiederholt und der Ablauf wird fortgesetzt.

2.6.1.3 Programmcode

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war es den Programmcode des Roboters zu entwickeln.

Das Programm ist in 8 Unterprogramme, Luos genannt, aufgeteilt. Hinzu kommen noch eine Initialisierungs- und eine „Shut down“-Routine. In diesen Rahmenprogrammen werden die einzelnen Stationen eingerichtet. So werden hier z.B. die Eingangsracks und der Heizblock für 8×5 Positionen, die Sondereinrichtungen der einzelnen Stationen (wie z.B. die Spritzentypen bei der Pipettierstation, oder der Typ der Roboterhand), die einzelnen Flüssigkeitsmengen und Routinezeiten und alle nötigen Variablen definiert. Die Proben durchlaufen diese Luos, wie bereits im letzten Kapitel erwähnt, in einem Pipeline-System.

Innerhalb des Luos herrscht eine sequentielle Struktur, die nur an wenigen Stellen durchbrochen ist. So läuft z. B. eine Parallelverarbeitung ab, bei der sowohl die Probe filtriert und gewaschen, als auch das Kochgefäß gereinigt und zurückgestellt wird.

Das Programm an sich wird in einer Assembler-Sprache programmiert, deren Befehlssatz stark an Basic orientiert und die von der Struktur her an Pascal angeglichen ist. Der vollständige Programmcode, der weitgehend vom Verfasser dieser Arbeit geschrieben wurde, liegt im Institut für Chir. Forschung vor. Im folgenden soll ein Programmschritt exemplarisch aufgezeigt werden. Dieses Unterprogramm läuft bei der Messung der Proben ab.

Hierbei wird zunächst das Programm PROBE.FUER.PHOTOMETER.VORBEREITEN aufgerufen. Die Zeilen 5 und 10 stellen eine Sicherheitsroutine dar, mit der erreicht wird, daß das Photometer sicher nur alle 8 min, das ist die maximale Dauer eines Meßzyklus, bedient wird. In Zeile 15 wird der Meßzyklus für eine Leerprobe gestartet. Diese Leerprobe entsteht, wenn bei der Filtration eine Probe wegen unvollständiger Verdauung aussortiert worden ist. Damit sich die Zählung der Proben bei der Messung nicht verschiebt, wird hier direkt gemessen (Zeile 500). In Zeile 20 wird das Sammelgefäß mit der Fluoreszenzflüssigkeit von der SPU getrennt. Die einzelnen Unterprogramme werden hier nicht aufgelistet. In Zeile 100 wird nun

das Sammelgefäß in den Ständer des Autosamplers gestellt. Zeile 200 würde einen Dreieckstausch auslösen, falls die Position im Autosamplerstander bereits besetzt wäre. In Zeile 300 wird nun durch ein Unterprogramm der Filterhalter mit dem verbrauchten Filter von der Trennstation genommen und anschließend verworfen. Im Unterprogramm PUT.INTO.PHOTOMETER wird die Probe in den Ständer des Autosamplers gestellt. Unter Zeile 1 wird zunächst eine Position in der Nähe des Gefäßhalters angefahren, die clear-Position. Dann werden eine Reihe von Flags (i.e. variable Parameter, die den momentanen Verarbeitungszustand der Probe charakterisieren), abgefragt und aktualisiert. Diese Parameter geben Auskunft über Position und Zustand der Probe. In Zeile 10 wird dann nochmals überprüft, ob die Roboterhand das Sammelgefäß hält, worauf es in Zeile 30 abgestellt wird. In diesen Programmzeilen wird die Struktur SE.RECOVERY.X wiederholt. Dies ruft eine jeweils zugehörige Routine auf, die dem Benutzer Korrekturanweisungen gibt. Im Falle von SE:RECOVERY.4 (die Station ist bereits besetzt) lautet sie beispielsweise:

```
'*** There is a container already in the station ***'  
  To continue with this command:  
  First: remove the container from the station MANUALLY.  
  Second: press <ENTER> to continue ...
```

Nachdem der Fehler beseitigt worden ist und die <ENTER>Taste gedrückt worden ist, arbeitet der Roboter an derselben Stelle weiter, an der er aufgehört hat.

In Zeile 200 wird nun das Messprogramm MEASUREMENT aufgerufen. Dieses Unterprogramm stellt eine bidirektionale Kommunikation zwischen Roboter-Controller und dem Controller des LS50B-Meßplatzsystems her. Zunächst wird nun ein Contactclosure an das LS50B gesendet (Zeile 1), woraufhin der Roboter auf ein ebensolches Signal von diesem wartet (Zeile 10). Erhält der Roboter-Controller kein Signal, so sendet er so lange ein Signal, bis der Meßplatz seine momentane Arbeit beendet hat und in der Lage ist, eine Rückantwort zu geben. Dies würde zu einer Endlosschleife führen, falls der Meßplatz aufgrund eines Hard- oder Softwarefehlers nicht mehr funktioniert. Der Roboter wird dann seine Routine solange

unterbrechen, bis der Benutzer in das System eingreift. Dadurch wird ein Probenverlust auf dieser Position vermieden. Mittels eines Schalters kann nach Behebung des Fehlers am Meßplatz die Endlosschleife übergangen werden.

```
PROBE.FUER.PHOTOMETER.VORBEREITEN  
DISPLAY OFF
```

```
    - 27.02.98 11:07:02      sr
```

```
5  HOURS =  CLOCK(4)  
   MINUTES =  CLOCK(2)
```

```
    - Abfrage für die Zeit 8min vor 0:00  
    IF HOURS < 23 THEN 10  
    IF MINUTES < 52 THEN 10  
    IF MINUTES.END > 52 THEN 10  
    GOTO 5
```

```
10  - Abfrage, ob das Spektrometer besetzt ist => es mißt noch  
    IF HOURS < HOURS.END THEN 5  
    IF MINUTES < MINUTES.END THEN 5
```

```
15  IF FILTER.OK(WORKING.SAMPLE) = 1 THEN 500
```

```
20  s:speed = 3  
    SAMPLE.NUMBER.PHOTOMETER(PHOTOMETER.INDEX)      =  
WORKING.SAMPLE  
    PUT.INTO.CAPPER  
    REMOVE.FUNNEL.FROM.TUBE
```

```
    - greift auf Höhe des Gewindes  
    CAPPER.HEIGHT = 2
```

```
    GET.FROM.CAPPER
```

```
    IF PHOTO = 1 THEN GOTO 200
```

```
100 PUT.INTO.PHOTOMETER  
    GOTO 300
```

```
200 PUT.INTO.PHOTOMETER2
```

```
300 GET.FUNNEL.FROM.CAPPER  
    DISPOSE.TO.WASTE  
    goto 1000
```

```
500 - mißt Leerprobe für Filter.ok =1, um Gesamtzahl der  
    Meßwerte aufrechtzuerhalten  
    MEASUREMENT
```

```
1000
```

```
PUT.INTO.Photometer
```

```
DISPLAY OFF
```

```

- 18.02.98 16:40:01      sr
- this program puts a container into Photometer rack
- photo = 1 : besetzt
PHOTO = 1
- Setup for recovery
SE:PY.COMMAND$ = 'PUT.INTO.PHOTOMETER'
SE:FLAG = 0

1  - move into the station
   S:NEXT.CLEAR.POS$ = 'S:SET.ABS ZC302:CLEAR'
   S:NEXT.ID = 20302
   S:EXECUTE.CLEAR

   - check for possible error conditions
   goto 10
   IF ERROR.CHECK = NO THEN 30
   IF S:VOL = -1 THEN SE:RECOVERY.6
   IF SE:FLAG = 1 THEN 100
   IF ZC302:VOL(PHOTOMETER.INDEX) < 0 THEN 10
   SE:RECOVERY.4
   ZC302:VOL(PHOTOMETER.INDEX) = -1
   GOTO 1
10  IF S:HAND.ID < 100 THEN 20
   IF S:HAND.ID > 149 THEN 20
   SE:RECOVERY.5
   IF SE:FLAG = 1 THEN 1

   - access the rack
30  S:TRANS.OFF
   S:SET.ABS ZC302:RACK
   S:C.REL$
   S:RELO
   MODULE WAIT
   S:VERTICAL = S:VERTICAL - 2
   S:GRIP = 180
   S:RESTORE
   S:RELO
   S:C.REL$ = 'S:RELO'
   S:C.REL.VALUE = 0
   S:VERTICAL = S:VERTICAL + 2

   - transfer container variables to the station
100 SE:FLAG = 0
   ZC302:VOL(PHOTOMETER.INDEX) = 1
   S:VOL = -1
200 MEASUREMENT
   ZC302:CLEAR
   ZC302:CLEAR2
1000

```

Measurement:

```

- 08.06.98 10:53:50      sr

- Proben messen
- LS50B wartet auf ein contact closure am pec.1.switch.6
1  PEC.1.SWITCH.6.ON
   Timer(1) = 1

```

```

wait for timer 1
PEC.1.SWITCH.6.OFF

- bidirectionale Kommunikation, LS50B sendet auf input 6
nach 2 s ein contact closure, falls der Meßzyklus gestartet
wurde
10 DO 20 TIMES
  IF PEC.1.INPUT.6 < 1 THEN 1000
  TIMER(10) = 0.2
  WAIT FOR TIMER(10)
  ENDDO

  GOTO 1

1000

```

2.6.2 Fluoreszenzmessung

Der Fluoreszenz-Meßplatz besteht aus den folgenden vier Komponenten: dem LS50B Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland), dem Autosampler, der Diluter-Station und dem Controller, der Fluoreszenzspektrometer und Autosamplereinheit miteinander koordiniert.

Die Software, mit der der Controller über einen Rechner gesteuert wird, ist in Visual Basic geschrieben und wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe entwickelt. Es soll hier allerdings nicht näher auf den Code eingegangen werden.

Ein Meßzyklus läuft folgendermaßen ab: Nachdem der Controller vom Roboter das Startsignal erhalten hat, startet der Autosampler und fährt zum Probenplatz im Autosamplerständer. Dort senkt sich eine Pipettenspitze in das Sammelgefäß der SPU und aspiriert über die Diluterstation gesteuert 700 µl der Fluoreszenzfarbstofflösung. Diese wird über ein Schlauchsystem in die Durchflußküvette des LS50B transportiert. Dort findet die Bestimmung der Fluoreszenzintensität statt. Nach abgeschlossener Messung wird die Probe in ein Abfallbehältnis entleert und Durchflußküvette und Schlauchsystem werden mit Ethanol gespült. Anschließend wird das komplette System mit Druckluft getrocknet.

2.7 In vitro Versuchsteil

2.7.1 Dichte der FM

Die FM wurden der spezifischen Dichte von Blutzellen angeglichen. Das spezifische Gewicht wurde von uns mittels eines kontinuierlichen Percoll®-Gradienten ermittelt. Hierzu wurde ein Zentrifugengefäß zunächst mit 10 ml Percoll gefüllt und in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Es formte sich ein kontinuierlicher Dichtegradient. Nun wurden Eichmikrosphären unterschiedlicher Farben zugegeben. Auch die zu bestimmenden FM wurden auf die Percoll-Lösung pipettiert. Bei der anschließenden Ultrazentrifugation lagerten sich die Eichbeats in den jeweiligen Dichteschichten ab.

2.7.2 Einfluß der verwendeten Flüssigkeiten

Während des Verarbeitungsprozesses wirken eine Reihe von Chemikalien auf die Mikrosphären ein. Zum Teil ist bekannt, daß diese Chemikalien (wie z.B. KOH) die Fluoreszenzfarbstoffe zerstören. Der Hersteller der FM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gibt an, daß in Mikrosphären inkorporierter Fluoreszenzfarbstoff inert gegenüber diesen Chemikalien ist. Diese Angabe zu überprüfen war das Ziel unseres ersten In vitro-Versuches. Verglichen wurden hierbei eine Referenzgruppe ohne Zusatzchemikalie mit Gruppen, die den verschiedenen Chemikalien zugeordnet waren. Die Chemikaliengruppen waren im Einzelnen: KOH mit Isopropanol, Phosphatpuffer, Formalin, Salzsäure und Essigsäure. Hierzu wurden ca. 10^5 Mikrosphären in je 10 Reagenzröhrchen pipettiert. Bei der Referenzgruppe wurde der Farbstoff sofort mittels 2 ml Cellosolve ausgelöst und die Fluoreszenzintensität bestimmt. In die Reagenzröhrchen der Chemikaliengruppen wurden ca. 5 ml der jeweiligen Chemikalien zugegeben, die Röhrchen verschlossen und an einem lichtabgeschirmten Ort verwahrt. Nach Ablauf von 24 h für die Lauge-, Säuren- und die Puffergruppe und 60 Tagen für die

Formalengruppe wurden die Chemikalien dekantiert und durch wiederholte Zentrifugen- und Dekantierschritte mittels Ethanol ausgewaschen. Nach der Trocknung der Röhrchen in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 45°C wurde der Farbstoff mit 2 ml Cellosolve ausgelöst und seine Intensität gemessen. Zur Auswertung wurden die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten der Chemikaliengruppen mit der Referenzgruppe verglichen.

2.7.3 Linearität von Anzahl FM zu Intensität

Bei der Verwendung von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Mikrosphären wird über die Konzentration des ausgelösten Farbstoffes auf die Anzahl der Mikrosphären rückgeschlossen. Voraussetzung ist eine direkte Proportionalität zwischen Anzahl der FM und Farbkonzentration.

Um die Fluoreszenzintensität pro FM zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe für jede FM-Spezies hergestellt. 6 Verdünnungsstufen enthalten zwischen 25 und 250 FM/ μ l. Aus diesen Lösungen wurden jeweils 10 μ l Proben entnommen und in Reagenzröhrchen aus Glas pipettiert. Das Lösungswasser wurde in wiederholten Zentrifugen- und Ethanolauswaschschritten entfernt und der Inhalt der Röhrchen wurde abschließend in einem Wärmeschrank bei 45°C getrocknet. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit 2 ml Cellosolve ausgelöst und die Farbintensität mit Hilfe des LS50B bestimmt. Zur Auswertung wurde die Korrelation zwischen den Verdünnungsschritten und der Fluoreszenzintensität bestimmt.

2.7.4 Einfluß der Probenverarbeitung

Vor der Anwendung der SPU im Tierexperiment wurden die SPUs einem In vitro-Test der gesamten Probenverarbeitung unterzogen. Es sollte dabei nachgewiesen werden, daß mittels der SPU die FM vollständig zurückgewonnen werden können und eine der Anzahl der FM

entsprechende Farbstoffkonzentration ausgelöst werden kann. Während des Verarbeitungsprozesses wirken hohe physikalische und chemische Kräfte auf den Filter ein. Deswegen wurden die Filter und Filtergewebe im Anschluß an die Probenverarbeitung unter dem Mikroskop auf Veränderungen ihrer Struktur hin untersucht.

Als Gewebeproben wurden formalinfixierte Organe (Niere, Leber, Gehirn und Muskel) von Schlachttieren verwendet. In jeden Filter wurden Gewebestücke (max. 5 g) gegeben. Zusätzlich wurden in jeden Filter ca. 10^4 FM ($\text{Ø}15\mu\text{m}$) jeder Farbe (blue, bluegreen, yellowgreen, orange, red, crimson und scarlet) zupipettiert. Um eine Referenzgruppe zu erhalten, wurde dieselbe Menge an FM ebenfalls in 20 Glasröhrchen pipettiert, die nach bereits beschriebenen Verfahren gewaschen und getrocknet wurden (s. 2.7.1).

Die Filter mit den organischen Geweben wurden dem gesamten Prozeß (Verdauung bei 60°C für 4 h, Filtration mittels Unterdruck, Reinigung mit Phosphatpuffer, Trocknen in der Zentrifuge und Auslösen der Fluoreszenzfarbstoffe durch Cellosolve) unterzogen. Zur Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitätswerte der Referenzgruppe mit denen der Gruppe, die den Verarbeitungsprozeß durchlief, verglichen.

Nach der Probenverarbeitung wurden die Filter in folgender Weise untersucht: Der pH-Wert wurde mittels pH-Indikator-Papier am Filter außen und innen ermittelt. Der Filter insgesamt wurde unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Dabei wurde besonderer Wert auf die Suche nach verbliebenen Verunreinigungen gelegt. Die Stelle, die die mechanisch labilste Verbindung darstellt, ist der Übergang vom Kunststoff des Filters zum Filtergewebe. Hier wurde nach Rissen und Läsionen gesucht. Das Filtergewebe im Gesamten wurde ebenfalls auf lichtmikroskopisch sichtbare Unregelmäßigkeiten in der Webstruktur hin untersucht.

2.7.5 Rückgewinnung der FM mit der SPU

Ziel jeder Methode, bei der FM zur Bestimmung der regionalen Organdurchblutung verwendet werden, ist es, diese vollständig aus der Organprobe zurückzugewinnen. Bei der hier verwendeten Filtrationsmethode mit Hilfe der SPU wird dies dadurch erreicht, daß alle FM nach der Verdauung des Probengewebes und der folgenden Filtration des Digestates auf dem Filtergewebe zu liegen kommen.

In diesem in vitro Versuch galt es nun zu beweisen, daß bei der Filtration keine FM verloren werden und keine FM an der Wand des Filters haften bleiben. Dort anhaftende FM könnten vom Lösungsmittel nicht erreicht werden und würden deshalb bei der Auswertung nicht erfaßt. Für diese in vitro Untersuchung wurden Herzgewebestücke (jeweils ca. 4 g) eines Schlachttieres (Schwein) zusammen mit je ca. 10^5 FM ($\varnothing 15 \mu\text{m}$) in 40 SPUs gegeben und diese nach dem beschriebenen Protokoll verarbeitet. Die Dichtigkeit der Filter wurde getestet, indem die filtrierte Digestionsflüssigkeit noch ein zweites Mal filtriert wurde. Hierbei wurden die von GLENNY (1993) validierten Filtermembranen verwendet. In dessen Versuchsaufbau werden PE-Lochmembranen mit einer Porenweite von $7 \mu\text{m}$ auf ein Metallgitter gelegt und die Flüssigkeit mittels Unterdruck filtriert. Wären unsere Filter nicht in der Lage, alle FM zurückzuhalten, müßten sich FM im Filtrat finden. Diese würden dann bei der zweiten Filtration auf der PE-Membran zu liegen kommen. Deshalb wurden die PE-Membranen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei verschiedenen Wellenlängen auf FM kontrolliert.

Um nach FM zu suchen, die möglicherweise an der Wand des Filters adhären, wurden die Filter zerschnitten. Die Filterwand wurde in 8 longitudinale Streifen zerteilt. Diese Filterteilstücke wurden dann ebenfalls unter dem Fluoreszenzmikroskop auf FM kontrolliert.

2.7.6 Wiederverwendung der Filter

Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung von FM gegenüber RM ist der, daß wegen des Wegfalls der Entsorgung von radioaktivem Abfall geringere Kosten entstehen. Jedoch benötigt man bei der FM-Methode Verbrauchsmaterialien. Der teuerste Posten dabei ist die SPU. Somit wäre es vom Kostenaspekt her wünschenswert, wenn die SPU wiederverwendet werden könnte.

Um dies zu überprüfen, wurde die Probenverarbeitung von Herzgewebestücken (jeweils ca. 3,4 -4,1 g) eines Schlachttieres zusammen mit je $1,0 \times 10^3$ µl einer Sphärenlösung, die $2,5 \times 10^3$ 15 µm große FM der Fluoreszenzfarbe orange enthalten, in 25 SPUs fünfmal wiederholt. Im Anschluß eines jeden Durchlaufes wurden die Filter unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 0,5 bis $1,4 \times 12,5$) auf Defekte hin untersucht. Besondere Beachtung fand dabei das Polyamidgewebe. Das Filtrat, das bei jeder Probenverarbeitung gewonnen wurde, wurde mittels der bereits oben erwähnten PE-Membran (2.7.4) ein zweites Mal filtriert. Diese Membranen wurden im Fluoreszenzmikroskop auf FM hin untersucht. Die Intensität der während der Probenverarbeitung gewonnenen Farbstofflösung wurde bestimmt. Diese wurde mit einer Referenzfarbstoffkonzentration verglichen, welche wie folgt gewonnen wurde: Aus derselben FM-Stammlösung, die für die SPU-Gruppe verwendet worden war, wurden ebenfalls 1000 µl entnommen und jeweils in 20 Glasröhrchen pipettiert. Diese wurden nach bekannten Schema (2.7.1) gewaschen, getrocknet und der Farbstoff ausgelöst und bestimmt.

2.7.7 Aufbereitung der Mikrosphären

Bei der Bestimmung der regionalen Organdurchblutung mittels Mikrosphären wird davon ausgegangen, daß die Anzahl der Mikrosphären proportional zum Blutfluß im jeweiligen Organ ist. Eine Möglichkeit der Verfälschung der Ergebnisse kann durch Paarbildung der Mikrosphären entstehen. So würden MS-Agglomerate bei der Injektion sich im Blutfluß

ähnlich wie eine einzelne FM verhalten, bei der Auswertung aber je nach ihrer Anzahl verrechnet werden. Dies würde zu einer Überschätzung des tatsächlichen Blutflusses führen.

FM tendieren auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften zur Adhärenz untereinander. Um bei der Injektion wieder einzelne FM zu erhalten, werden diese nach folgendem Schema aufbereitet: 3 min Aufschütteln im Vortex, 5 min Ultraschallbad gefolgt von 1 min Vortexbehandlung. Um nachzuweisen, daß hierbei einzelne FM in der Lösung sind, wird eine Probe der Lösung durch ein modifiziertes Durchflußzytometer (FLUVO V, Institut für Chirurgische Forschung, München, WIETZOREK, 1997) analysiert. Hierbei werden die FM durch einen Rubinkristall mit einer zentralen Öffnung gesandt, an dessen Ende eine Spannung angelegt wird. Die Spannungsänderung gibt Auskunft über die Größe der FM.

Somit können hierbei zwei Qualitätskontrollen durchgeführt werden. Zum einen wird die Größenverteilung der FM kontrolliert und zum anderen können Paar- und Tripletbildungen erkannt werden. Hierbei wurde die Größen der 10 μm und 15 μm FM aller Farben mit Eichbeats der Größen 10 μm und 15 μm verglichen.

2.8 In vivo Experiment

2.8.1 Versuchstiere

SPU, Probenverarbeitung und Kalkulation der Blutflußwerte wurden im Tierexperiment validiert. Als Versuchstiere wurden männliche, kastrierte Schweine (n=8) der deutschen Landrasse verwendet. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 20 und 45 kg. Die Tiere wurden vom Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilians-Universität, München in Oberschleißheim bezogen und einige Tage vor dem chirurgischen Eingriff in der Tierhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung aufgestellt. Hier herrschten folgende Haltungsbedingungen: Temperatur 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 40% und 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. In den Boxen wurde Stroh als Einstreu verwendet. Die Ernährung erfolgte mit handelsüblichem Futter und Trinkwasser ad libidum.

Für das Experiment wurden nur Tiere zugelassen, deren Allgemeinbefinden unauffällig war und die keine Anzeichen einer Erkrankung aufwiesen.

Der Tierversuch war von der Regierung von Oberbayern am 06.11.1996 unter dem Aktenzeichen 211-2531.3-35/96 genehmigt.

2.8.2 Narkoseführung

Zunächst wurden die Tiere am Morgen des Versuchstages in der Box mittels Ketamin (Ketanest, Parke-Davis, Berlin, Deutschland, 10 mg/kg KG), Midazolam (Dormicum, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 0,3 mg/kg KG) und Atropin (ASTA Medica, Frankfurt, Deutschland, 0,02 - 0,05 mg/kg KG) prämediziert und sediert. Zur folgenden Narkoseeinleitung wurden mittels eines venösen Zuganges (Abbocath 20G) in einer Ohrrendvene das Neuroleptanalgetikum Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Neuss, Deutschland, 5-10

ml Gesamtdosis) und das Hypnotikum Midazolam (Dormicum, 0,3 mg/kg KG) appliziert. Nach Relaxation mit Pancuronium (0,1 mg/kg KG, Schwabe-Curamed, Karlsruhe, Deutschland) und endotrachealer Intubation (ID 5,5 bzw. 6,0, Rüsch, Kernen, Deutschland) wurde mit der mechanischen Ventilation mittels Respirator (Siemens 900 B, München, Deutschland) begonnen. Die Narkose wurde dann mit Fentanyl (Fentanyl-Janssen, 0,02 mg/kg KG/h) und Pentobarbital (Nembutal, Nycomed, München, Deutschland) fortgeführt. Zur Volumensubstitution wurde eine Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) verwendet.

Nach Beendigung des Experimentes wurden die Tiere mittels einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert.

2.8.3 Überwachung

Während der gesamten Dauer des Experimentes wurden folgende Parameter kontinuierlich kontrolliert: Blutdruck, Herzfrequenz, EKG, Atemminutenvolumen, Atemfrequenz und respiratorischer Quotient. Jeweils vor und nach einer Mikrosphäreninjektion wurden folgende Parameter protokolliert:

Hämodynamik: systolischer, mittlerer und diastolischer systemischer Blutdruck (RR_{sys} , MAP, RR_{dia}), Herzfrequenz (HF), systolischer, mittlerer und diastolischer pulmonalarterieller Blutdruck (PAP_{sys} , PAP_{mean} , PAP_{dia}), zentralvenöser Druck (ZVD), pulmonalarterieller Verschlussdruck (PCWP), Cardiac Output (CO).

Atemmechanik: Atemfrequenz (AF), expiratorisches Tidalvolumen (t_{ex}), Atemwegsdrücke (PEEP, p_{max} , p_{plat}), inspiratorische Sauerstoffkonzentration (F_{iO_2}), expiratorische Kohlendioxidkonzentration (et_{CO_2})

Blutgasanalyse: jeweils arteriell und gemischtvenöse Sauerstoffsättigung (HbO_2), Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), pH-Wert, Baseexzess (ABE).

2.8.4 Chirurgische Präparation

Die Methode der Blutflußbestimmung mittels Mikrosphären bedarf der Einbringung von zwei Kathetern. Zum einen wird ein Katheter (14 G, Edwards, Anasco, Puerto Rico) in den linken Vorhof platziert, über den die Mikrosphären injiziert werden. Zum anderen wird ein zweiter (14 G, Edwards, Anasco, Puerto Rico) in der Aorta platziert, über den die arterielle Referenzprobe entnommen wurde. Hierfür wurde nach einem Hautschnitt an der rechten Oberschenkelinnenseite die A. femoralis profunda dargestellt und frei präpariert. Über dieses Gefäß wurde nach Punktion ein Katheter in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Dieser Zugang diente zur Entnahme der arteriellen Blutreferenzprobe.

Zur Überwachung des Versuchstieres (Blutgase, Füllungsdrücke) und zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter HZV, PVR, SVR, ZVD, PCWP usw. wurden noch folgende Katheter eingeführt:

Für drei weitere Katheter wurde der cervicale Zugangsweg gewählt. Hierzu wurde beidseits der M. sternocleidomastoideus getastet und medial davon ein Hautschnitt gesetzt. Auf der linken Seite wurden A. carotis externa und V. jugularis externa dargestellt. Über die Carotis wurde ein Katheter (Millar Mikrotip Pressure Transducer, Nellcor, Hayward, CA, USA) in die Aorta descendens platziert, und der arterielle Blutdruck bestimmt. Über die Jugularvene wurde ein zentraler Venenkatheter (ZVK, 2-Lumen, Edwards, Anasco, Puerto Rico) in die V. cava superior geschoben. Dieser wurde für therapeutische Zwecke (Volumensubstitution, Narkose) genutzt. Cervical rechts wurde ebenfalls die V. jugularis externa dargestellt und eine Schleuse (7 Fr., Edwards, Anasco, Puerto Rico) eingebracht, über die ein Swan-Ganz-Katheter (Edwards, Anasco, Puerto Rico) eingeführt wurde. Dieser wurde druckkontrolliert mit geblocktem Ballon in die Pulmonalarterie vorgeschoben.

Die korrekte Lage der Katheter wurde anschließend radiologisch mittels Kontrastmittelgabe (Peritrast, Köhler, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) kontrolliert.

Nach der Implantation der Katheter wurde eine mediane Thorakotomie durchgeführt. Hierzu wurde das Sternum auf seiner ganzen Länge durchtrennt. Diffuse Blutungen aus dem Knorpel wurden mit Knochenwachs gestoppt. Nach Aufsuchen der Aorta thoracalis wurde eine Flow-Probe (T208 transonic volume flowmeter, Nellcor, Hayward, CA, USA) um diese gelegt. Mit ihr wurde das Herzzeitvolumen bestimmt. Als nächstes wurde der Katheter für die Mikrosphäreninjektionen platziert. Hierzu wurde das linke Atrium aufgesucht und das Pericard dort eröffnet. Das Auriculum cordis wurde mit einer gepolsterten Klemme vorsichtig fixiert und mit einer Kanüle perforiert. Durch die Perforationsstelle hindurch wurde der Katheter in das Atrium eingebracht und die Inzision mit einer Tabaksbeutelnaht wieder verschlossen.

Um eine intraoperative Harnableitung zu erreichen wurde eine mediane Laparotomie im Unterbauch durchgeführt. Die Blase wurde dargestellt, punktiert und ein Blasenkateter (8 Ch) eingebracht. Anschließend wurde die Blase über eine Tabaksbeutelnaht wieder verschlossen. Ebenso wurde die Laparotomiewunde mittels einer Faszien- und Kutannaht wieder verschlossen.

2.8.5 Injektion der Mikrosphären

2.8.5.1 Vorbereitung

Um die Vergleichbarkeit von radioaktiven und fluoreszierenden Mikrosphären zu überprüfen, wurde die gleiche Anzahl von beiden MS-Spezies simultan injiziert. Es wurden jeweils Mikrosphären der Größe 15µm verwendet.

Die radioaktiven Mikrosphären (NEN-Trac®, Du Pont, Bad Homburg, Deutschland) waren mit den folgenden Isotopen beladen: Chrom (Cr 51), Strontium (Sr 85), Niob (Nb 95), Cerium

(Ce 141), Indium (In 114) und Scandium (Sc 46). Vor dem Experiment wurde die Dotierung der Tracersubstanzen bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot der Mikrosphärensuspension entnommen und die Anzahl der Mikrosphären unter dem Mikroskop ausgezählt. Anschließend wurde die Gesamtaktivität der ausgezählten Probe in einem γ -Counter (Canberra Packard, Ontario, Kanada) bestimmt. Da davon auszugehen ist, daß die Sphären gleichmäßig mit Isotopen beladen sind, kann somit die Aktivität pro Mikrosphäre bestimmt werden.

Die fluoreszierenden Mikrosphären (Molecular Probes®, Eugene, Oregon, USA) waren mit den zum Zeitpunkt des Experiments kommerziell erhältlichen sieben Farbstoffen beladen (blue, bluegreen, yellowgreen, orange, red, crimson und scarlet). Auch hier wurde wiederum die Tracermenge pro Sphäre bestimmt. Zunächst wurden ca. 10^5 Mikrosphären aus dem Originalgefäß entnommen. Diese Suspension wurde im Vortex 2 min aufgeschüttelt und 10 min im Ultraschallbad (Sonorex TK52H, Bandelin, Deutschland) behandelt. Danach wurde nach einem erneuten kurzen Aufschütteln die Mikrosphärenkonzentration/10 μ l bestimmt. Dazu wurden mit einer Eichspritze 10 μ l der Lösung entnommen und die Anzahl an Sphären mittels des bereits oben erwähnten Durchflußzytometers bestimmt. Anschließend wurde in einem Aliquot der Lösung die Fluoreszenzintensität der Mikrosphären bestimmt. Mit den erhaltenen Daten ließ sich die Fluoreszenzintensität pro Mikrosphäre berechnen.

2.8.5.2 Injektion

Für die Injektionen wurden jeweils zufällige Paare aus einer fluoreszierenden und einer radioaktiven Mikrosphären-Spezies gebildet. Die Anzahl wurde nach folgender Formel berechnet.

$$N_{\min} = 400 \times n / (Q_{\text{organ}} / Q_{\text{total}}) \quad \text{wobei gilt:}$$

$N_{\min}$ = minimale Anzahl der zu

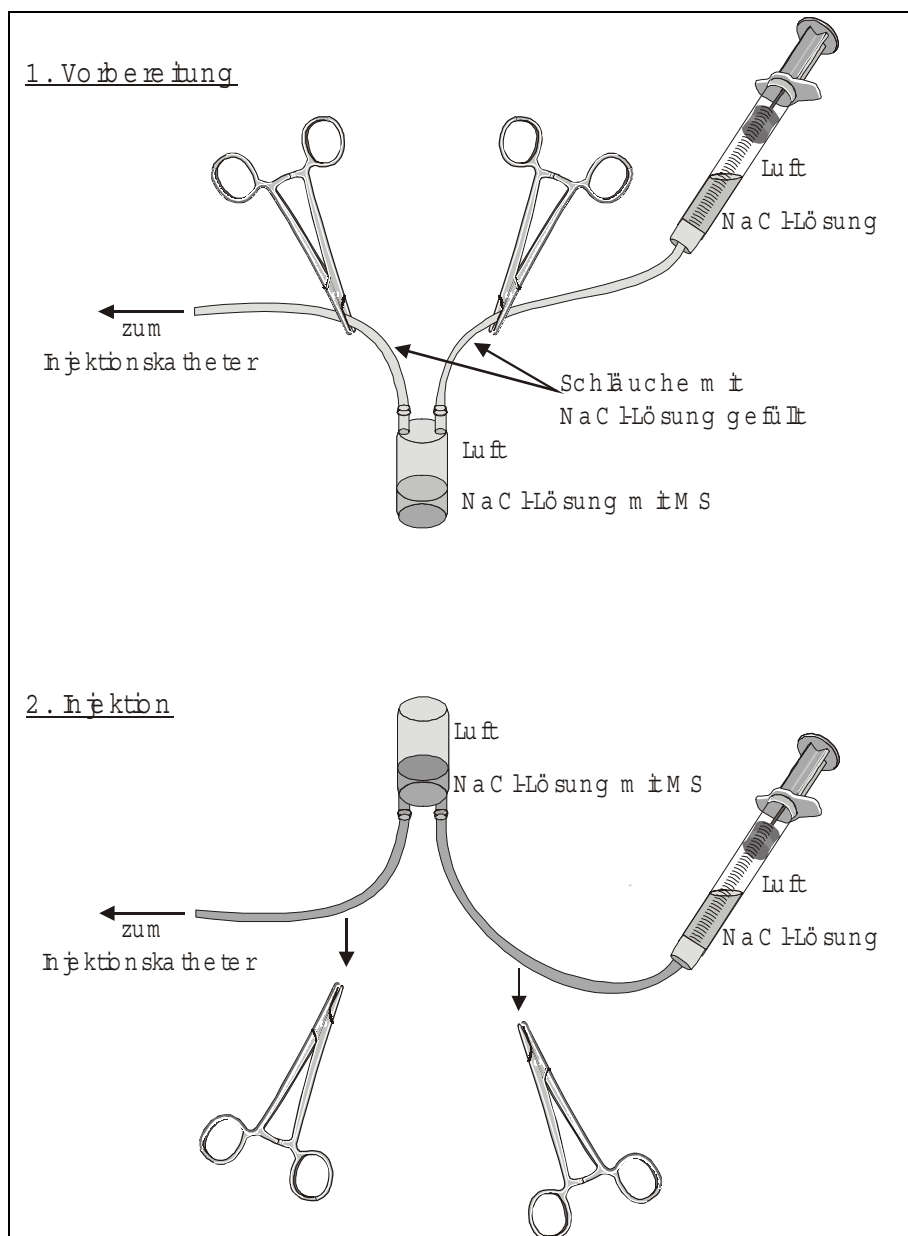
injizierenden FM

n = Anzahl der Geweproben, in die das

Organ aufgeteilt wird

$Q_{\text{organ}} / Q_{\text{total}}$ = Anteil des Organs am HZV

Vor der Injektion mußten die Stammlösungen der jeweiligen Mikrosphären gleichzeitig vorbereitet werden. Hierzu wurden zunächst die Aufbewahrungsgefäße für die jeweiligen Mikrosphären in einem Vortex (Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) drei Minuten lang mechanisch geschüttelt. Sodann wurden die Gefäße fünf Minuten lang mit Hilfe eines Ultraschallbads (Sonorex, Bandelin, Berlin, Deutschland) sonikiert. Hierdurch sollen aneinanderhaftende Mikrosphären voneinander separiert werden. Nach einem zweiten Schütteln über einen Zeitraum von einer Minute im Vortex wurde die berechnete Anzahl an Mikrosphären aus den jeweiligen Gefäßen entnommen und in eine Injektionskammer verbracht (Abb. 2-12.).



Die Kammer war ein speziell für diesen Zweck angefertigtes Glasbehältnis mit ca. 15 ml Volumen. Es handelte sich dabei um ein zylinderförmiges Gefäß, dessen eine Seite mit einem Boden verschlossen und dessen andere Seite mit zwei Einlässen versehen war, an die Schläuche angeschlossen werden konnten. Der eine von diesen war mit dem

Abbildung 2-12. Injektionssystem für Mikrosphären

Injektionskatheter verbunden, wohingegen am anderen eine 50-ml-Spritze angeschlossen ist. Diese ist mit 25 ml physiologischer Kochsalzlösung und mit 25 cm³ Luft gefüllt.

Vor der Injektion wurde die Abzugspumpe ('33`Syringe Pump, FMI, Egelsbach, Deutschland), in die eine 50-ml-Perfusor-Spritze eingespannt war, zur Entnahme der arteriellen Referenzprobe gestartet. Die Abzugsgeschwindigkeit betrug 3,24 ml min⁻¹. Sobald Blut im Schlauch des Referenzentnahmesystems sichtbar war, wurde mit der Injektion begonnen. Dazu wurden beide Klemmen über den Schläuchen gelöst und unter dosiertem Stempeldruck die Injektionskammer mit der Kochsalzlösung aus der Spritze gespült. Mit der in der Spritze

vorhandenen Luft wurde nun das Injektionssystem geleert, ohne dem Versuchstier Luft zu injizieren. Die Injektion dauerte zwischen 50 und 60 sec und wurde, um interpersonelle Schwankungen auszuschließen, stets von derselben Person ausgeführt.

Während der Injektion lief die Pumpe zur Entnahme der arteriellen Referenzprobe mit konstanter Geschwindigkeit weiter. Die Pumpe wurde erst 2 min nach Injektionsende angehalten, um sicher zu gehen, daß alle Mikrosphären, die sich eventuell noch im linken Herzen befanden, erfaßt wurden. Nach Pumpenstopp wurde das Blut in ein Szintillationsgefäß transferiert und das Entnahmesystem mit 2×10 ml einer 0,3% Tween Lösung gespült, welche ebenfalls zur Referenzprobe gegeben wurde.

Dieser Vorgang der Simultaninjektionen von radioaktiven und fluoreszierenden Mikrosphärenpaaren wurde in jedem Experiment 6-mal wiederholt. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurde jeweils eine 15 min dauernde Stabilisationsphase gewährt, an deren Ende die oben beschriebenen (2.8.3) physiologischen Parameter protokolliert wurden.

Nach Abschluß der letzten Injektion wurde das Versuchstier mittels einer Überdosis Barbiturat euthanasiert. Anschließend wurden die Organe, in denen der Blutfluß bestimmt werden sollte entnommen. Dies waren: Herz, Nieren, Leber, Magen, Dünndarm, Milz und Muskel (Psoas). Im Folgenden wird v. a. auf die Bestimmung des regionalen Blutflusses in Leber und Nieren eingegangen.

Element	Nuklid	Halbwertszeit
Chrom	Cr 51	27,7 d
Strontium	Sr 85	64,8 d
Niobium	Nb 95	34,9 d
Cerium	Ce 141	32,5 d
Indium	In 114	49,5 d
Scandium	Sc 46	83,8 d

Tabelle 2-4. Verwendete Nuklide und Halbwertszeiten

2.9 Probenverarbeitung

2.9.1 Präparation der Organe

Nachdem die Organe entnommen worden waren, erfolgten einige vorbereitende Schritte. Zunächst wurden die Organe von Blutrückständen gereinigt. Dann wurden minderperfundierte akzessorische Organgewebe, wie z.B. die bindegewebige Kapsel der Niere, das bindegewebige Nierenbecken oder die Gallenblase bei der Leber entfernt. Anschließend wurde das Nativgewicht des Organs bestimmt.

2.9.2 Fixierung der Gewebeproben

Einige Organe wie z.B. Herz und Leber sollten hinsichtlich der späteren Dissektion fixiert werden. Dies geschah mittels einer 10 % Formalinlösung. Zur Fixation blieben die Organe mindestens 7 Tage in der Lösung.

2.9.3 Dissektion der Organe

Um während einer Versuchsserie statistisch relevante Aussagen über die regionale Organperfusion treffen zu können, ist es notwendig, immer die gleichen Areale eines Organs verschiedener Versuchstiere zu untersuchen. Darüber hinaus sollte auch die unterschiedliche Perfusion verschiedener Areale eines Organs untersucht werden. Die hierfür notwendige lokale Präzision wird am besten anhand eines hierarchischen Dissektionsprotokolls erreicht.

Die Tabelle 2-4 zeigt, daß zunächst in linke und rechte Niere und sodann für die jeweilige Niere in eine ventrale und dorsale Hälfte unterschieden wird. Nachdem die oberen und unteren Pole, deren Bereich bis zum jeweiligen Mark-Rinden-Übergang reicht, abgetrennt sind, wird der verbleibende Rest gedrittelt. Die Anzahl der jeweiligen Abschnitte sollte der jeweiligen Tierspezies angepasst werden. Ebenso sollte die Anzahl der Teile je nach der Notwendigkeit

der Auflösungsgenauigkeit variiert werden. Für die hier verwendete Spezies Schwein hat sich eine Drittelung als günstig erwiesen. Jedes Drittel wurden nun ein weiteres Mal in drei Abschnitte disseziert, und zwar entlang der beim nativen Organ gut sichtbaren Übergänge von äußerer Rinde, innerer Rinde und Mark. Somit erhält man eine Gesamtzahl von 44 Gewebestücken aus beiden Nieren.

Nr.	Organ	Seite			
1	Niere	links	ventral	oberer Pol	
2				oberes Drittel	äußere Rinde
3					innere Rinde
4					Mark
5				mittleres Drittel	äußere Rinde
6					innere Rinde
7					Mark
8				unteres Drittel	äußere Rinde
9					innere Rinde
10					Mark
11				unterer Pol	
12			dorsal	oberer Pol	
13				oberes Drittel	äußere Rinde
14					innere Rinde
15					Mark
16				mittleres Drittel	äußere Rinde
17					innere Rinde
18					Mark
19				unteres Drittel	äußere Rinde
20					innere Rinde
21					Mark
22				unterer Pol	
23		rechts	ventral	oberer Pol	
24				oberes Drittel	äußere Rinde
25					innere Rinde
26					Mark
27				mittleres Drittel	äußere Rinde
28					innere Rinde
29					Mark
30				unteres Drittel	äußere Rinde
31					innere Rinde
32					Mark
33				unterer Pol	
34			dorsal	oberer Pol	
35				oberes Drittel	äußere Rinde
36					innere Rinde
37					Mark
38				mittleres Drittel	äußere Rinde
39					innere Rinde
40					Mark
41				unteres Drittel	äußere Rinde
42					innere Rinde
43					Mark
44				unterer Pol	

Tabelle 2-5. Hierarchisches Dissektionsschema der Niere. In den einzelnen Spalten sind Probennummer, Organ und von links nach rechts die hierarchischen Ebenen dargestellt.

Von der Leber wurden, nachdem große Blutgefäße und Gallengänge entfernt worden waren, 60 ca. 5 g schwere Gewebeproben entnommen. Dabei wurde die Leber auf einer gedachten Linie vom rechten zum linken Leberlappen disseziert.

2.10 Berechnung und Statistik

2.10.1 Radioaktive Methode

Vor der Organverarbeitung nach dem Schema der oben beschriebenen Methode für fluoreszierende Mikrosphären wurde die Radioaktivität der Proben entsprechend den verwendeten Nukliden bestimmt. Hierzu wurden die Proben in tarierte Szintillationsgefäße eingebracht und das Probengewicht wurde mittels des Computerprogrammes MIC-III (GROSS et al., 1990) bestimmt und datentechnisch gespeichert. Dies ist die erste Arbeitsroutine, die das MIC-III Programm für die Verarbeitung für radioaktive Proben vorgab. Als nächstes wurden die Organ- und Blutreferenzproben in den γ -Counter (Canberra Packard, Frankfurt am Main, Deutschland)) gestellt. Die Steuerung dieses Gerätes und die anschließende Auswertung übernahm wiederum das am Institut für Chirurgische Forschung entwickelte MIC-III Programm. Im γ -Counter wurde die Aktivität jeder Probe für einen Zeitraum von drei Minuten gemessen und auch die Energie jedes γ -Teilchens bestimmt. Somit war es möglich jede Zerfallsregistrierung dem jeweiligen Nuklid zuzuordnen.

Datentechnisch waren damit das Gewicht der Probe, das Aktivitätsspektrum der jeweiligen Organprobe, die Aktivität der Referenzprobe und die Aktivität pro Mikrosphäre erfaßt. Es folgte eine automatische Berechnung der Anzahl der Mikrosphären pro Probe und des Blutflusses in ml/min/g. Diese Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der Hintergrundstrahlung und unter Verrechnung des Zeitintervalls zwischen der Dotierung der Mikrosphären und ihrer Auswertung.

2.10.2 Fluoreszenz-Methode

Nach der Auswertung der Proben gemäß der radioaktiven Methode, was in der Regel 2-3 Tage Zeit in Anspruch nahm, erfolgte die Bestimmung des Blutflusses nach der Methode für fluoreszierende Mikrosphären. Dafür wurden die Gewebeproben den Szintillationsgefäßen entnommen und in mit Barcodemarkierungen versehene und vom Roboter tarierte SPU's verbraucht. Die weitere Probenverarbeitung gemäß dem obigen Protokoll lief mit dem zuvor beschriebenen Roboter unter Verwendung des exemplarisch aufgezeigten Programmes automatisch ab. Dabei wurden die Fluoreszenzspektren mittels des Fluoreszenzspektrometers LS 50 B (Perkin Elmer, Bodenseewerk, Überlingen, Deutschland) bestimmt.

Obwohl der Roboter die Gewichte ein zweites Mal bestimmt hatte, wurde das während der radioaktiven Methode bestimmte Feucht-Gewicht verwendet. Dadurch sollte ein Fehler durch Austrocknung der Proben und einer daraus folgenden Gewichtsreduzierung vermieden werden. Für die Berechnung der regionalen Organperfusion (ARCHIE, 1974 und MCDEVITT, 1976) geht man von folgender Überlegung aus:

Der Fluß in der Gewebeprobe ist direkt proportional zur Anzahl der enthaltenden MS:

$$F_{\text{Org}} = \alpha \times C_{\text{Org}} \quad \text{wobei gilt:}$$

F_{Org} = Fluß in der Gewebeprobe

C_{Org} = Anzahl der Mikrosphären in der Gewebeprobe

α = Proportionalitätsfaktor

Ebenso gilt diese Annahme in der arteriellen Referenzprobe:

$$F_{\text{art}} = \alpha \times C_{\text{art}} \quad \text{wobei gilt:}$$

F_{art} = Fluß in der arteriellen Referenzprobe

C_{art} = Anzahl der Mikrosphären in der Referenz

α = Proportionalitätsfaktor

Löst man beide Gleichungen nach dem Proportionalitätsfaktor auf, so ergibt sich folgende Gleichung:

$$F_{\text{Org}} = \frac{F_{\text{Art}}}{C_{\text{Art}}} \cdot C_{\text{Org}}$$

Um nun auch mehrere Gewebeproben unterschiedlichen Gewichtes miteinander vergleichen zu können, wird der Fluß noch hinsichtlich des Gewichtes korrigiert.

$$F_{\text{Org}} = \frac{F_{\text{Art}}}{C_{\text{Art}}} \cdot C_{\text{Org}} \cdot \frac{1}{m} \quad \text{wobei gilt: } m = \text{Masse der Gewebeprobe}$$

Der Fluß der arteriellen Referenzprobe F_{Art} stellt die Pumpengeschwindigkeit der Referenzpumpedar. Diese ist mit 3,24 ml/min für die Experimente festgelegt. Somit stellt das arterielle Referenzsystem ein virtuelles Organ mit definiertem Fluß dar. Die Anzahl der Mikrosphären C_{Art} bzw. C_{Org} kann errechnet werden, da die Konzentration des gemessenen Fluoreszenzfarbstoffes direkt proportional zur Anzahl der Mikrosphären ist:

$$C_{\text{Org}} = \beta \times \text{Int}_{\text{Org}} \quad \text{wobei gilt:}$$

Int_{Org} = Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes in der
Organprobe

β = Proportionalitätsfaktor

ebenfalls gilt:

$$C_{\text{Art}} = \beta \times \text{Int}_{\text{Art}} \quad \text{wobei gilt:}$$

Int_{Art} = Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes in der
arteriellen Referenzprobe

β = Proportionalitätsfaktor

Da bei der Berechnung der regionalen Organperfusion nach obiger Formel unter Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Anzahl der Mikrosphären und der Intensität des

gemessenen Farbstoffes der Proportionalitätsfaktor β im Zähler und Nenner steht, ergibt sich nach Elimination desselben folgende Formel:

$$F_{\text{Org}} = \frac{F_{\text{Art}}}{\text{Int}_{\text{Art}}} \cdot \text{Int}_{\text{Org}} \cdot \frac{1}{m}$$

Der errechnete Fluß erhält damit die Einheit ml/min/g.

2.11 Statistische Auswertung

Sämtliche Daten der In vitro-Versuche wurden mittels Student-t-Test ausgewertet. Dabei wurde das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ festgelegt. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Im Tierexperiment wurden die Blutflußwerte, die mit radioaktiven bzw. mit fluoreszierenden Mikrosphären bestimmt worden waren, nach einem Verfahren verglichen, welches Bland und Altman (BLAND und ALTMAN, 1986) beschrieben haben. Hierbei wird eine etablierte Methode in Vergleich zu einer neuen Methode gestellt. Der Vergleich wird in einem Diagramm graphisch dargestellt. An der Abszisse wird das arithmetische Mittel eines Wertepaares aus etablierter und neuer Methode aufgetragen. An der Ordinate wird die prozentuale Differenz der neuen gegenüber der alten Methode gezeichnet. Der Mittelwert dieser Differenz stellt den Bias der neuen Methode dar. Die Präzision erhält man aus der Standardabweichung, die sich aus allen prozentualen Abweichungen ergibt. Gefordert wird, daß 95% aller Werte innerhalb der doppelten Standardabweichung liegen müssen. Die graphische Auswertung dieses statistischen Verfahrens wurde mit Hilfe des Programmes SigmaPlot 3.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

2.12 Kontrolle der automatischen Verarbeitung durch den Roboter

Bei der Aufteilung der Mikrosphären innerhalb eines Blutgefäßsystems handelt es sich um eine zufällige, den Gesetzen der Statistik folgenden Verteilung (BUCKBERG, 1971). Für die Validierung der neuen Methode heißt dies, daß eine genügend große Anzahl an Gewebeproben erfaßt und zur Auswertung kommen muß, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können. Schwierig ist es aber, eine Aussage in Bezug auf eine einzelne Probe zu machen. Eine Abweichung könnte hier zum einen durch die zufällige Aufteilung der Mikrosphären im biologischen Experiment zustande kommen oder aber auch durch einen Fehler während der Auswertung.

Da der Roboter die Proben automatisch abarbeitet und während dieses Vorgangs nur schwer zu kontrollieren ist, galt es eine Möglichkeit zu finden, die korrekte Funktion des Roboters zu überwachen.

Bei den einzelnen Tierexperimenten wurden jeweils 6 FM/RM-Paare eingesetzt. Eine 7. Farbe der FM blieb jeweils frei. Von dieser Farbe wurden ca. 2500 FM zu den Gewebeproben in den SPU zupipettiert (Kontrolle). Diese hier als Kontrolle bezeichnete FM-Spezies wurde vom Roboter gemeinsam mit den Gewebeproben verarbeitet und die Fluoreszenzintensität automatisch bestimmt. Zusätzlich wurde eine Referenzgruppe mit $n = 30$ angelegt. Hier wurden die FM lediglich in Reagenzröhrchen pipettiert, getrocknet, der Farbstoff ausgelöst und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Der statistische Vergleich beider Gruppen (t-Test) wurde zur Kontrolle des Roboters verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Versuche

3.1.1 Dichte der FM

Anhand der Höhenbeziehung zu den Eichmikrosphären lässt sich das spezifische Gewicht der FM ablesen. Es ergab sich eine Dichte von 1,06 g/ml für die FM. Dies stimmt nahezu mit der Herstellerangabe von 1,05 g/ml überein. Die Dichtemessung wurde auch für die RM durchgeführt. Es ließ sich aber kein Percollgradient größer 1,8 mg/dl erzeugen, sodaß die Dichte der RM nur mit >1,8 mg/dl in diesem Versuch bestimmt werden konnte.

3.1.2 Einfluß der verwendeten Chemikalien

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3-1) von Referenz-, KOH-, Phosphatpuffer- und HCl-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant. Die Mittelwerte variieren zwischen 61,4 AU und 63,5 AU. Dabei liegt die Standardabweichung zwischen 3,1 und 4,1. Nur Essigsäure ($34,4 \text{ AU} \pm 2,8$) zeigt einen signifikanten Unterschied zu allen hier verwendeten Flüssigkeiten.

Dieses Ergebnis zeigt die Eignung der verwendeten Chemikalien zur Probenverarbeitung. Eine organische Säure wie z.B. CH_3COOH sollte demnach nicht verwendet werden.

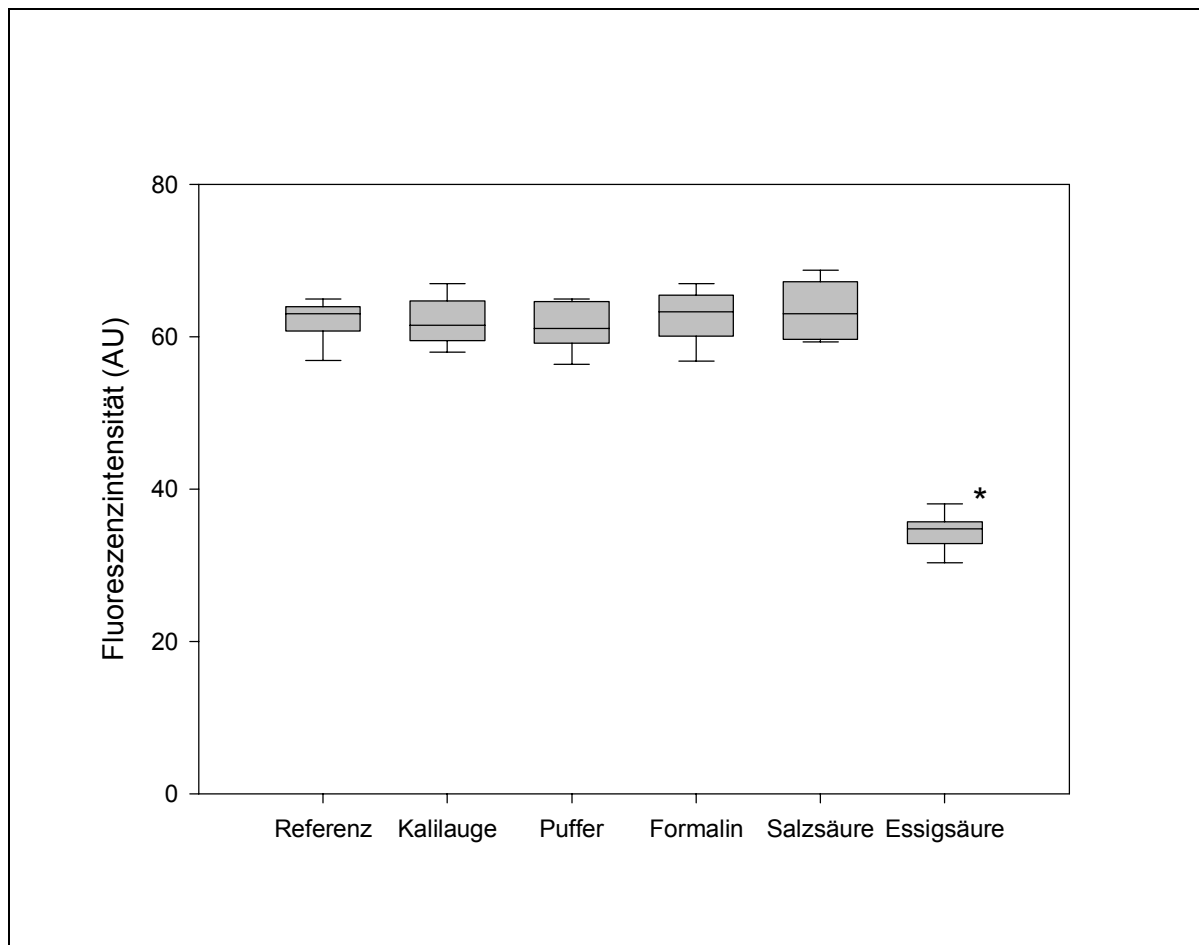


Abbildung 3-1. Boxplotdarstellung ($n=10$ pro Gruppe) des Einflusses verschiedener Chemikalien auf den Fluoreszenzfarbstoff. Nur Essigsäure bewirkt einen signifikanten Verlust an Fluoreszenzintensität ($p<0,005$).

3.1.3 Linearität der Fluoreszenzintensität zur FM-Anzahl

Für alle FM Spezies zeigt sich eine sehr gute Korrelation (r^2 zwischen 0,98 und 0,99) zwischen der Anzahl der FM und der Fluoreszenzintensität der ausgelösten Farbstofflösungen. Dies zeigt nicht nur den konstanten Gehalt an Farbstoff pro FM, sondern beweist auch die Eignung unseres Messgerätes (LS50B, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland). Bis zu einer Intensität von 400 AU, entsprechend hier 2500 FM, zeigen sich für keine Farbe Abweichungen in der Linearität der Messung, wie sie z.B. durch Überlastung des Photomultipliers hervorgerufen werden könnten.

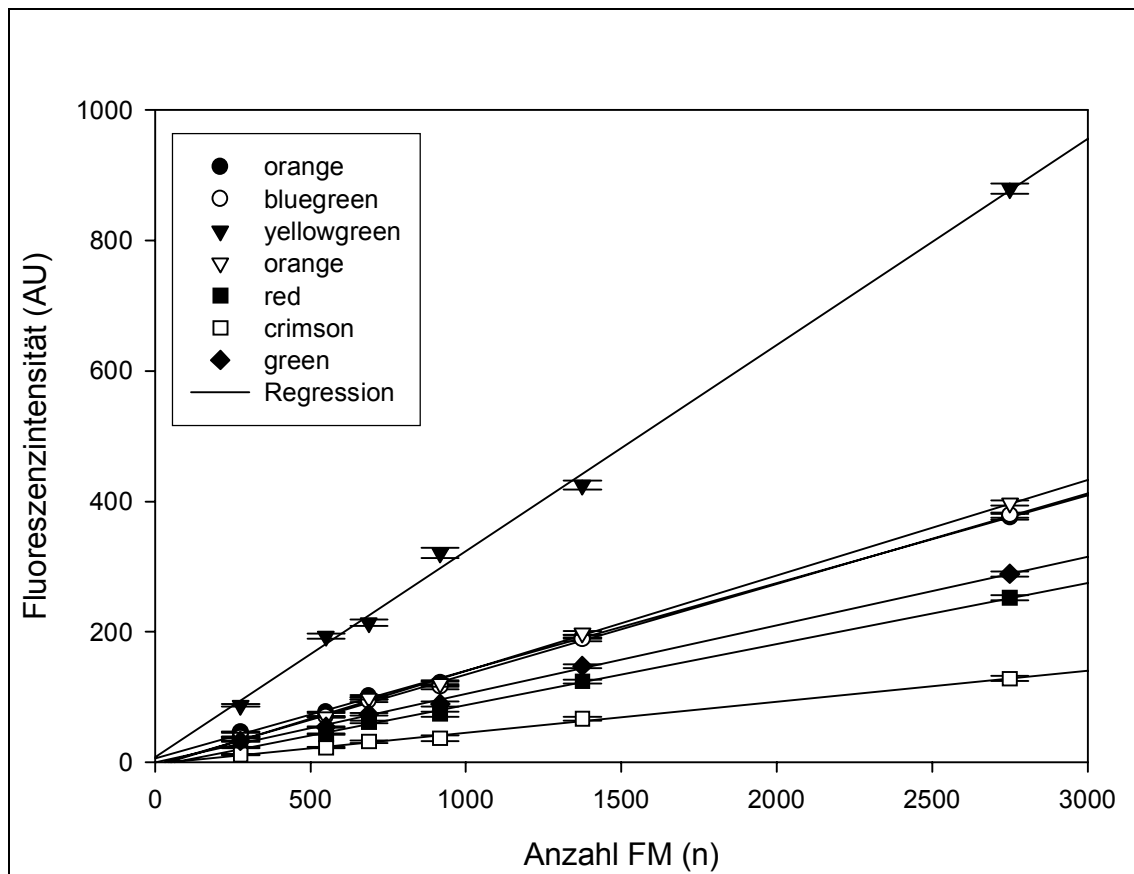


Abbildung 3-2. Dargestellt sind Standardabweichungen und Regressionsgeraden der einzelnen Farben. Die Korrelationen der Anzahl der Mikrosphären zur Fluoreszenzintensität betragen zwischen $r^2=0,98$ und $r^2=0,99$. Die Regressionsgeraden weisen nahezu einen Nulldurchgang (-8,4 bis 5,1) auf. Ihre Steigungen (0,10 bis 0,21) geben die Fluoreszenzintensität pro FM wieder.

In Abb. 3-2. ist der Zusammenhang zwischen Anzahl und Fluoreszenzintensität für sieben Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt. Bei sehr geringen Standardabweichungen ergeben sich sehr gute Korrelationen (zwischen $r^2=0,98$ und $r^2=0,99$). Die Regressionsgeraden weisen nahezu einen Nulldurchgang (-8,4 bis 5,1) auf.

Über die hier ermittelte Regression kann im Tierexperiment die Anzahl der FM pro Organprobe ermittelt werden.

Farbe	blue		bluegreen		orange		red		crimson	
Lot	L5070	L5478	L7181	L5478	L5072	L5478	L5073	L5478	L5079	L5478
Cellosolve	0,232	0,153	0,19	0,139	0,191	0,192	0,202	0,104	0,098	0,056
Ethoxy	0,218	0,153	0,206	0,123	0,154	0,165	0,176	0,105	0,082	0,048

Tabelle 3-1. Aufgelistet sind die verschiedenen Regressionskoeffizienten (Anzahl FM vs. Fluoreszenzintensität) in Abhängigkeit von FM-Farbe, FM-Lot und verwendetem Lösungsmittel

In Tabelle 3-1 sind für die Farben blue, bluegreen, orange, red und crimson die verschiedenen Regressionen tabellarisch dargestellt. Diese Werte wurden mit einer Exzitationsschlitzweite von 4 und einer Emissionsschlitzweite von 8 am LS50B (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) ermittelt. Es erwies sich, daß jede FM-Charge unterschiedliche Werte aufwies. Auch die Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln (z.B. Cellosolve oder Ethoxy) beeinflusste den Wert.

3.1.4 Einfluß der Probenverarbeitung

Zwischen der Referenzgruppe und der SPU-Gruppe gab es für alle getesteten Farben keine signifikanten Unterschiede. Im folgenden sind die einzelnen Mittelwerte und Standardabweichungen der Referenzgruppe versus SPU-Gruppe für alle Farben angegeben:

blue $53,3 \pm 5,4$ vs. $53,3 \pm 2,2$, bluegreen $57,9 \pm 5,8$ vs. $50,7 \pm 2,8$, yellowgreen $103,5 \pm 9,8$ vs. $109,2 \pm 4,2$, orange $59,0 \pm 5,9$ vs. $63,8 \pm 2,8$, red $34,4 \pm 3,5$ vs. $36,9 \pm 1,7$, crimson $23,8 \pm 2,6$ vs. $24,1 \pm 1,8$ und scarlet $32,8 \pm 4,2$ vs. $33,8 \pm 6,0$ (Abb. 3-3).

Das pH-Indikatorpapier zeigte durchwegs neutrale Werte, was für eine suffiziente Spülung der Filter mit Pufferlösung spricht. Bei der mikroskopischen Überprüfung der Filter ergaben sich keine Auffälligkeiten. Insbesondere waren Filter und Filtergewebe fest miteinander verbunden. Das Filtergewebe war - soweit lichtmikroskopisch beurteilbar - intakt. Die Filter waren frei von sichtbaren Rückständen.

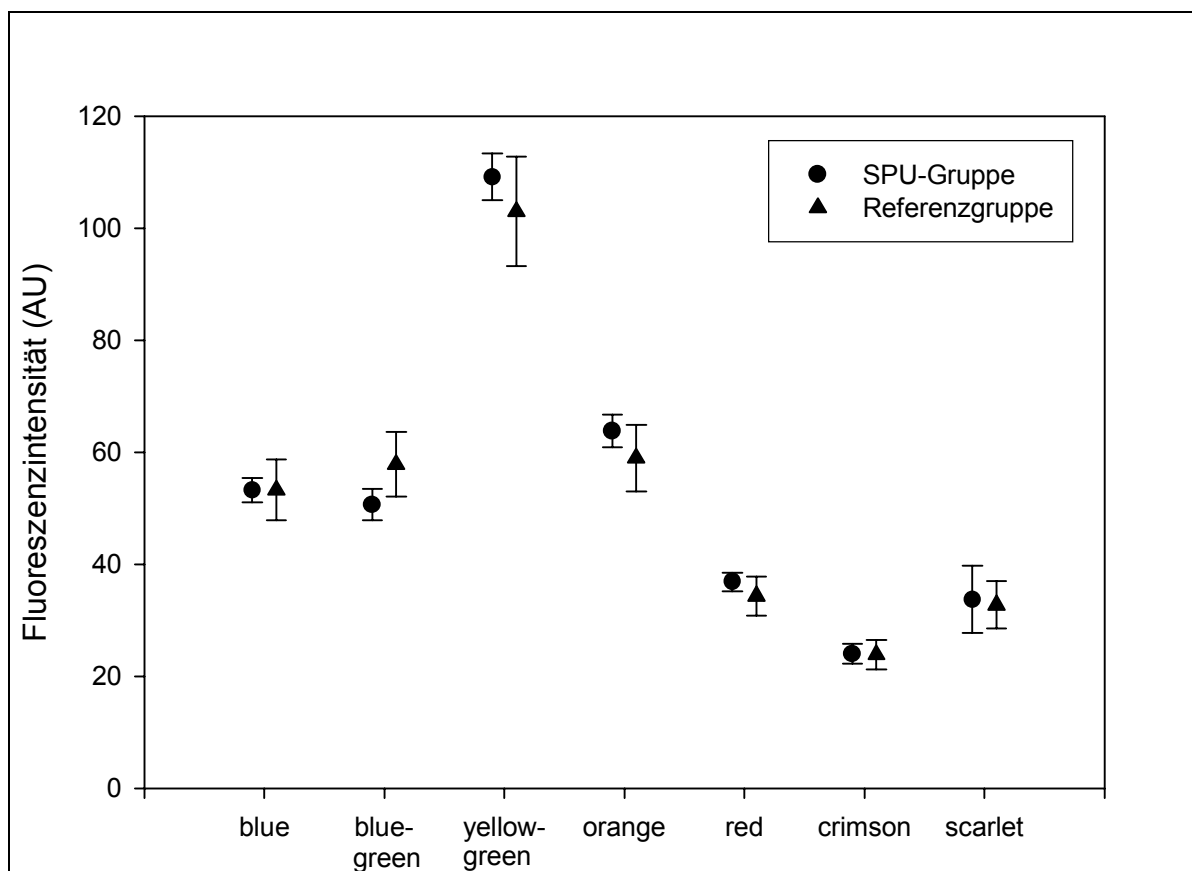


Abbildung 3-3. Fluoreszenzintensitäten der Referenz- und SPU-Gruppen im Vergleich. Dargestellt sind für jede Farbe Mittelwert und Standardabweichung. Zwischen den Gruppen ergab sich für keine Farbe ein signifikanter Unterschied ($n=20$ pro Gruppe und Farbe).

Nach Lagerung der Farben über 46 Tage hinweg und erneuter Messung der Fluoreszenz entstand keine signifikante Änderung der Meßwerte. Dabei war es irrelevant, ob die Farblösungen im Kühlschrank bei 5°C oder unter Umgebungstemperatur (ca. 25°C) aufbewahrt wurden.

Ebenso hat ein Verschließen des Farbbehälters keine Auswirkung auf das Meßergebnis.

Gleichwohl sich alle Werte zum Zeitpunkt $t=46$ d nicht von $t=0$ unterscheiden, zeigt sich beim verschlossenen Röhrchen, welches unter Umgebungstemperatur gelagert wurde, die geringste Standardabweichung ($\pm 0,015$) bei der kleinsten relativen Abweichung vom Ausgangswert ($-0,013$).

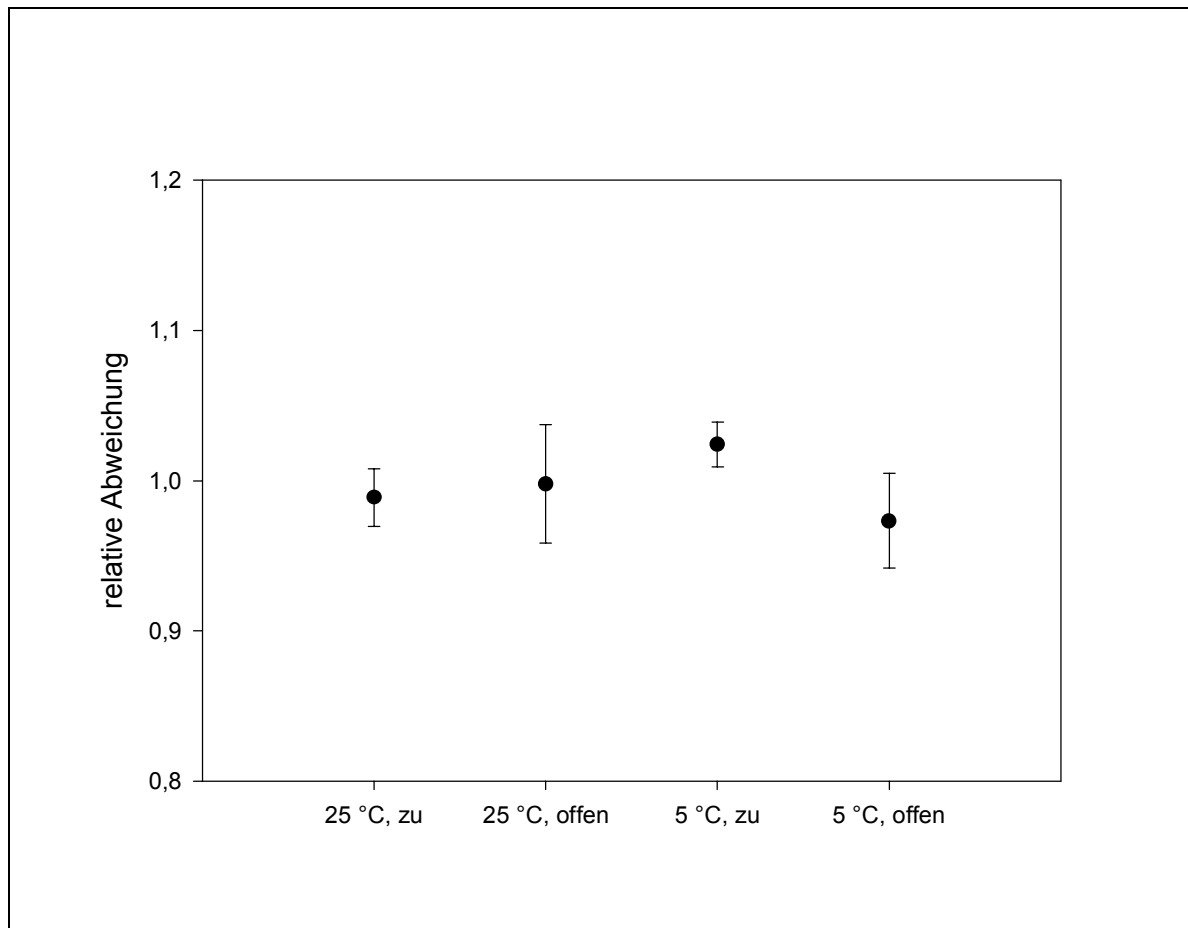


Abbildung 3-4. Relative Abweichung einer zweiten Messung nach 46 Tagen vom Ausgangswert. Hier exemplarisch für die Farbe yellowgreen. Die Proben wurde bei 5°C bzw. 25°C respektive offen bzw. geschlossen aufbewahrt ($n=20$ pro Meßpunkt).

3.1.5 Wiederfindung der FM mit der SPU

Auf keinem der PE-Filter konnten 15 μ m große FM nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß das Filtrat, welches die SPU passiert hatte, frei von 15 μ m FM ist. Somit verbleiben alle FM im Filter der SPU.

An den Wänden der Filter wurden keine adhärierenden FM unter dem Lichtmikroskop gefunden. Als Ergebnis kann daher eine vollständige Wiederfindung der FM mittels der SPU angenommen werden.

3.1.6 Wiederverwendung der Filter

Alle 25 Filter konnten bei der Erstbenutzung die FM vollständig zurückhalten. Bei der zweiten Benutzung trat bei einem Filter bereits ein geringer Verlust (1,8%) an FM auf. Bei der fünften Wiederverwendung der Filter waren 4 Filter (16%) undicht. Die gemessene Fluoreszenzintensität zeigte keine signifikante Abweichung innerhalb der 5 Versuche.

In der lichtmikroskopischen Untersuchung der Filter zeigten sich Aufhellungen und Aufschwellungen im Filtergewebe. Direkte Undichtigkeiten wie Defektstellen konnten in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden.

Filterbenützung	1	2	3	4	5
defekte Filter	0	1	1	3	4
max. FM im Filtrat (%)	0	1,8	2,1	3,5	3,8
Fluoreszenzintensität	48,3 ± 3,4	47,7 ± 4,1	48,5 ± 2,8	46,4 ± 5,2	46,1 ± 5,4

Tabelle 3-2. 4 von 25 Filtern waren bei der 5. Wiederverwendung undicht. Zwar zeigt sich eine Tendenz in der Abnahme der Fluoreszenzintensität, doch ist diese nicht signifikant.

3.1.7 Aufbereitung der Mikrosphären

Die aufwendige Aufbereitung der FM erbrachte eine sehr gute Separierung der FM. Lediglich bei einer Farbe (scarlet) waren nach der Aufbereitung im Vortex und Ultraschallbad noch 6,2% Doublets von gemessenen 5000 FM nachweisbar. Diese Farbe ist zuletzt von Molecular Probes entwickelt worden. Eine Erklärung wäre, daß hier die Tween-Konzentration in der Aufbewahrungsflüssigkeit verändert worden ist. Nachfragen bei der Firma bestätigten die

Reduzierung der Tween-Konzentration bei den neueren Chargen. Triplets oder höhere Aggregationen konnten bei keiner FM-Sorte nachgewiesen werden.

Der Durchmesser der FM lag außer bei der Farbe scarlet etwas oberhalb der angegebenen Größe von 15 μm und rangierte zwischen $13,65 \pm 0,48 \mu\text{m}$ und $17,02 \pm 0,88 \mu\text{m}$ (Tab. 3-3).

Farbe	Durchmesser (μm)	StAbw. (μm)	Doublets	Triplets
blue	16,97	0,89	0,00%	0,00%
bluegreen	17,02	0,84	0,00%	0,00%
yellowgreen	17,02	0,88	0,00%	0,00%
orange	16,96	0,99	0,00%	0,00%
red	16,97	0,87	0,00%	0,00%
crimson	16,96	0,92	0,00%	0,00%
scarlet	13,65	0,48	6,20%	0,00%
Eichbeats	15	0,51	0,00%	0,00%

Tabelle 3-3. Die Vermessung der 15 μm FM im Durchflußzytometer zeigt lediglich bei der Farbe scarlet in 6,2% eine Paarbildung. Der Durchmesser der 15 μm FM ist im Mittel bis zu 2 μm größer als angegeben.

Die 10 μm FM hatten eine höhere Neigung zur Aggregation. So hatten hier die FM der Farben blue (4,85%), yellowgreen (6,42%), crimson (3,61%) und scarlet (5,27%) sich zu geringen Anteilen zu Paaren aneinander gelagert. Höhere Aggregationen konnten nicht nachgewiesen werden. Der gemessene Durchmesser der 10 μm FM lag zwischen $9,47 \pm 0,65 \mu\text{m}$ und $10,76 \pm 0,67 \mu\text{m}$ und entspricht somit den Herstellerangaben.

Farbe	Durchmesser (μm)	StAbw. (μm)	Doublets	Triplets
blue	9,52	0,62	4,85%	0,00%
bluegreen	9,47	0,65	0,00%	0,00%
yellowgreen	10,76	0,67	6,42%	0,00%
orange	10,62	0,66	0,00%	0,00%
red	10,65	0,67	0,00%	0,00%
crimson	10,75	0,65	3,61%	0,00%
scarlet	9,48	0,64	5,27%	0,00%
Eichbeats	10	0,58	0,00%	0,00%

Tabelle 3-4. Die Vermessung der 10 μm FM im Durchflußzytometer zeigte bei 4 Farben zwischen 3,61% und 6,42% Paarbildung. Der Durchmesser der 10 μm FM entspricht den Herstellerangaben.

3.2 In vivo-Experimente

3.2.1 Physiologische Parameter

Während der Tierexperimente wurden die hämodynamischen und respiratorischen Parameter (s. 2.8.3.) nach der chirurgischen Präparation und vor jedem Meßzeitpunkt erhoben. Über diesen Zeitraum blieben die Werte stabil. Nur bei Tier 1 und 6 trat eine Erhöhung des aortalen Druckes auf und bei Tier 7 erhöhte sich die Herzfrequenz. Diese Veränderungen waren während des Versuchsablaufs reversibel. Es wurden nur die bereits aufgeführten Medikamente zur Narkoseführung eingesetzt. Nahezu alle Werte lagen im physiologischen Bereich. Lediglich bei Tier 6 bestand eine geringe Azidose ($\text{ABE } -3,1 \pm 1,5$).

Nr.	Gewicht (kg)	Herzfrequenz (/min)	mAOP (mmHg)	ZVD (mmHg)	HZV (l/min)
1	45,0	$100,0 \pm 8,6$	$135,1 \pm 21,6^*$	$10,4 \pm 0,8$	$5,9 \pm 0,2$
2	29,0	$147,5 \pm 9,9$	$145,1 \pm 8,5$	$7,6 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,4$
3	29,0	$114,8 \pm 6,9$	$105,0 \pm 6,0$	$6,3 \pm 1,0$	$4,3 \pm 0,1$
4	25,0	$94,6 \pm 3,8$	$96,3 \pm 4,0$	$5,1 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,1$
5	29,5	$106,6 \pm 1,3$	$118,5 \pm 2,0$	$4,8 \pm 1,0$	$3,6 \pm 0,2$
6	24,5	$104,8 \pm 4,7$	$113,5 \pm 20,0^*$	$7,6 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,2$
7	22,0	$118,0 \pm 17,2^*$	$118,8 \pm 6,5$	$5,0 \pm 1,4$	$2,6 \pm 0,1$
8	29,0	$116,8 \pm 3,0$	$98,3 \pm 1,0$	$4,3 \pm 1,4$	$4,6 \pm 0,3$

Tabelle 3-5. Mittelwerte und Standardabweichungen der erhobenen Parameter. Diese wurden nach der chirurgischen Präparation und vor jedem Meßzeitpunkt erhoben. Die mit *gekennzeichneten Werte zeigten eine signifikante Veränderung. Diese Änderung war jedoch reversibel.

Nr.	Gewicht (kg)	ABE (mmol/l)	Hb (g/dl)	Hb-O2 (%)	pH
1	45	$2,8 \pm 0,8$	$9,8 \pm 0,4$	$96,6 \pm 1,6$	$7,48 \pm 0,01$
2	29	$-1,5 \pm 2,2$	$9,9 \pm 0,4$	$97,9 \pm 0,4$	$7,36 \pm 0,03$
3	29	$-1,5 \pm 0,9$	$8,9 \pm 1,1$	$95,6 \pm 2,2$	$7,37 \pm 0,05$
4	25	$0,2 \pm 1,0$	$8,1 \pm 0,6$	$97,8 \pm 0,5$	$7,43 \pm 0,01$
5	29,5	$0,2 \pm 0,4$	$10,1 \pm 0,8$	$97,4 \pm 0,3$	$7,39 \pm 0,01$
6	24,5	$-3,1 \pm 1,5^*$	$9,3 \pm 0,1$	$95,3 \pm 0,7$	$7,29 \pm 0,04$
7	22	$-0,5 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,1$	$94,7 \pm 3,0$	$7,38 \pm 0,03$
8	29	$-0,2 \pm 1,4$	$8,4 \pm 0,1$	$96,7 \pm 1,0$	$7,40 \pm 0,01$

Tabelle 3-6. Mittelwerte und Standardabweichungen der erhobenen Parameter. Diese wurden nach der chirurgischen Präparation und vor jedem Meßzeitpunkt erhoben. Der mit

**gekennzeichnete Wert war außerhalb des physiologischen Normbereiches. Es trat keine signifikante Änderung auf.*

Nr.	Gewicht (kg)	AMV (l/min)	Resp. Quotient	Atemfrequenz (/min)
1	45	7,5 ± 0,08	1,05 ± 0,02	12,0 ± 0
2	29	5,1 ± 0,1	0,92 ± 0,04	12,0 ± 0
3	29	4,6 ± 0,4	0,77 ± 0,02	12,0 ± 0
4	25	4,6 ± 0,08	0,92 ± 0,03	11,8 ± 0,4
5	29,5	4,6 ± 0,4	0,93 ± 0,03	12,5 ± 0,5
6	24,5	4,8 ± 0,2	0,99 ± 0,04	12,6 ± 0,6
7	22,0	3,9 ± 0,3	0,88 ± 0,11	12,3 ± 0,5
8	29,0	5,4 ± 0,08	0,88 ± 0,03	13,8 ± 0,4

Tabelle 3-7. Mittelwerte und Standardabweichungen der erhobenen Parameter. Diese wurden nach der chirurgischen Präparation und vor jedem Meßzeitpunkt erhoben. Es trat keine signifikante Änderung auf.

3.2.2 Vergleich der Blutflußwerte RM versus FM

3.2.3 Regionaler Blutfluß der Leber

Allen acht Versuchstieren wurde die Leber entnommen. Vom anatomischen Lobus hepatis dexter wurden je 60 Gewebeproben für die Untersuchung verwendet und der Rest der Leber verworfen. Bei der Verarbeitung der Proben mit dem Roboter ergaben sich allerdings Probleme. Da Leber ein sehr bindegewebsreiches Organ ist, wurden unsere Filtergewebe durch unverdautes Gewebe verstopft. Erst durch Anpassung der Kochzeit (Verlängerung auf 6 h), Erhöhung der Molarität der KOH (6 M), Erhöhung der Alkoholkonzentration und der Einführung eines Prüfschrittes nach der Verdauung war es möglich die Organproben der Leber fehlerfrei zu verarbeiten. Aufgrund der vielfältigen Anpassungen war es erst im Experiment 8 möglich die Leber eines Versuchstiers vollständig zu verdauen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Die Auswertung nach BLAND und ALTMAN (1986) ergibt eine sehr gute Übereinstimmung beider Meßmethoden. Die mittlere Abweichung liegt zwischen -4,75% und 3,79% für die einzelnen Farben. Dabei variiert die einfache Standardabweichung zwischen -8,42% und

18,7%. In dieser Darstellungsform wird für eine valide Übereinstimmung gefordert, daß 95% der Werte innerhalb der doppelten Standardabweichung liegen. Dies ist für alle Farben gegeben.

Die einzelnen Korrelationskoeffizienten (r^2) für die Farben liegen zwischen 0,85 und 0,99. Die folgenden Abbildungen zeigen die Bland-Altman-Plots für die Leber im Experiment 8.

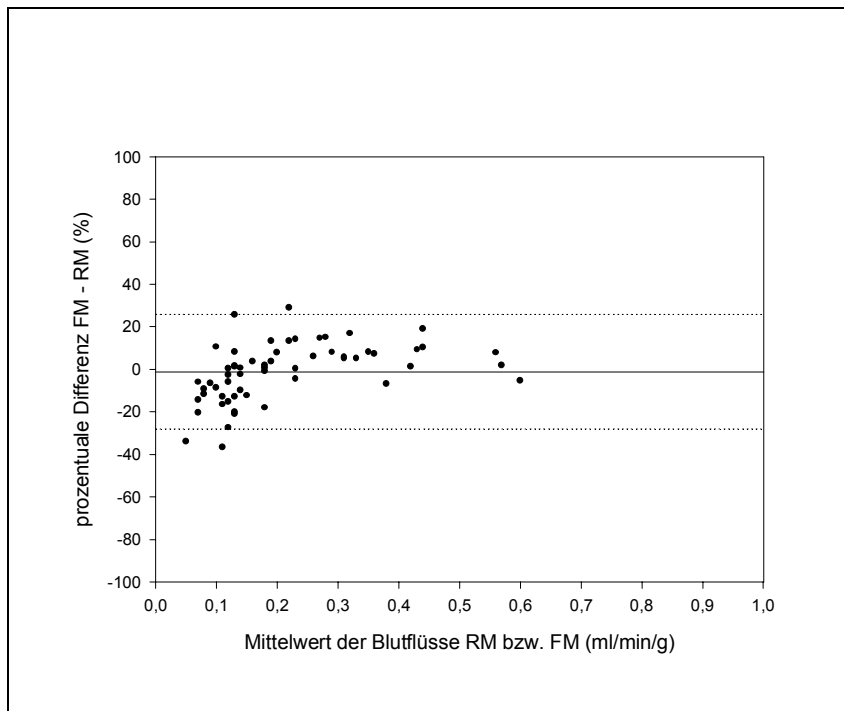


Abbildung 3-5.
Repräsentative Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Leber (Exp. 8). Die FM (blue) weichen im Mittel um -1,22% ($\pm 13,5\%$) ab. 95% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 60$

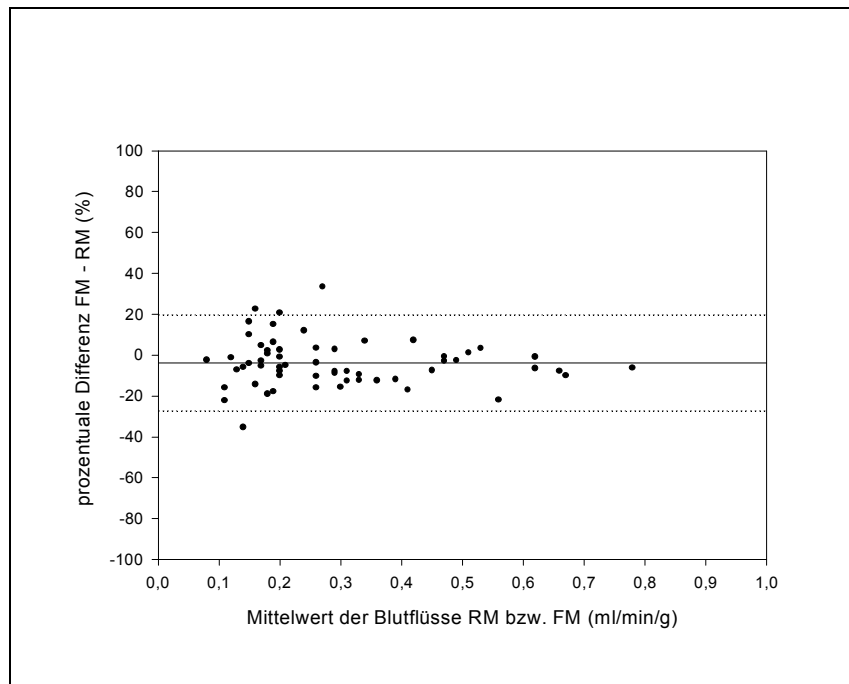


Abbildung 3-6.
Repräsentative Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutfluß-werte der Leber (Exp. 8). Die FM (bluegreen) weichen im Mittel um -3,79% ($\pm 11,7\%$) ab. 95% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 60$

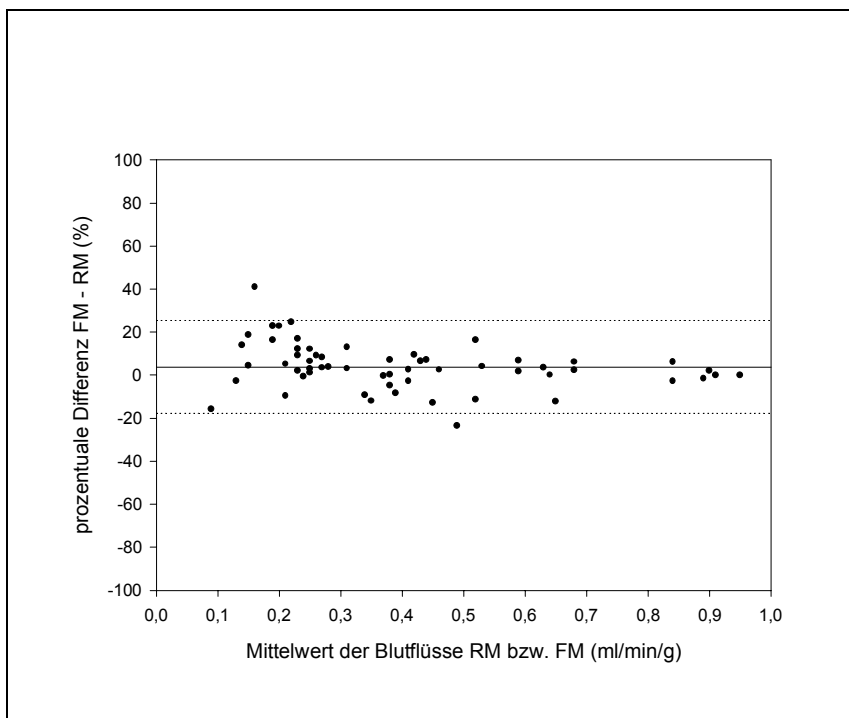


Abbildung 3-7.
Repräsentative Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Leber (Exp. 8). Die FM (orange) weichen im Mittel um 3,73% ($\pm 10,8\%$) ab. 96,7% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 60$

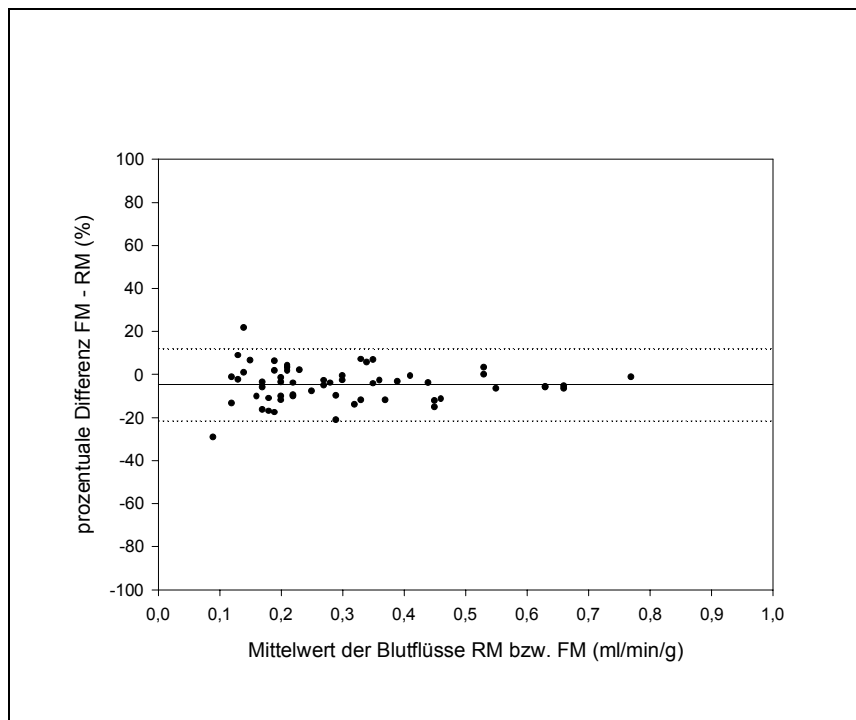


Abbildung 3-8.

**Repräsentative Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Leber (Exp. 8). Die FM (red) weichen im Mittel um -4,75% ($\pm 8,42\%$) ab. 96,7% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 60$**

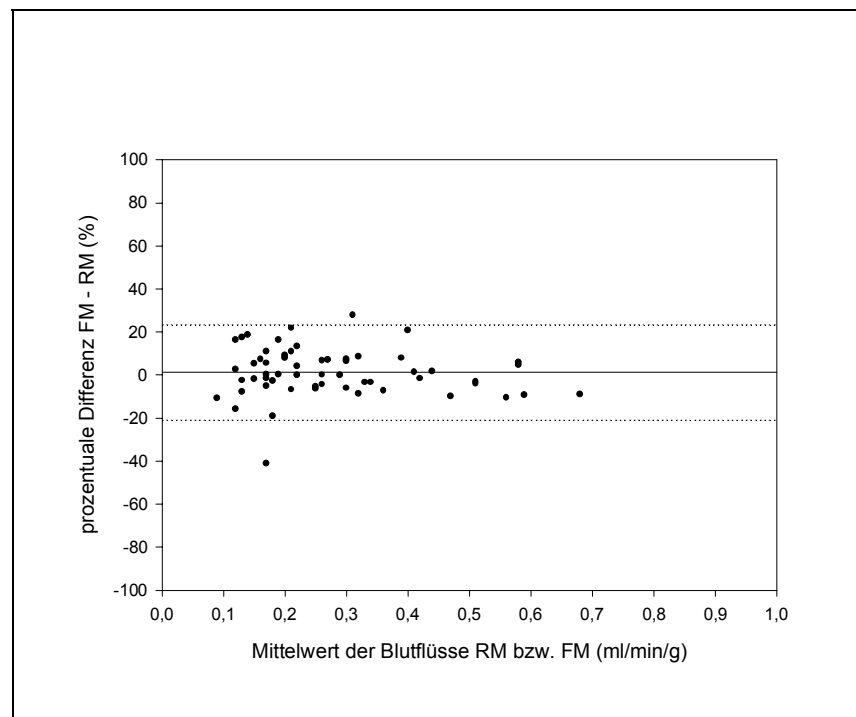


Abbildung 3-9.

**Repräsentative Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Leber (Exp. 8). Die FM (crimson) weichen im Mittel um 1,18% ($\pm 11,1\%$) ab. 96,7% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 60$**

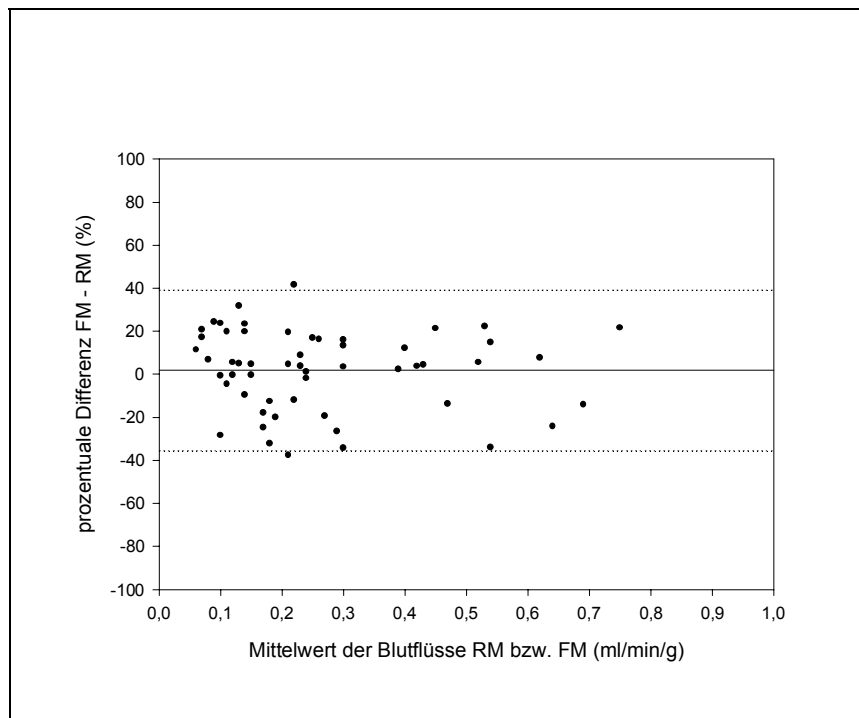


Abbildung 3-10.
Repräsentative Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Leber (Exp. 8).
Die FM (scarlet) weichen im Mittel um 1,85% ($\pm 18,7\%$) ab.
96,7% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 60$

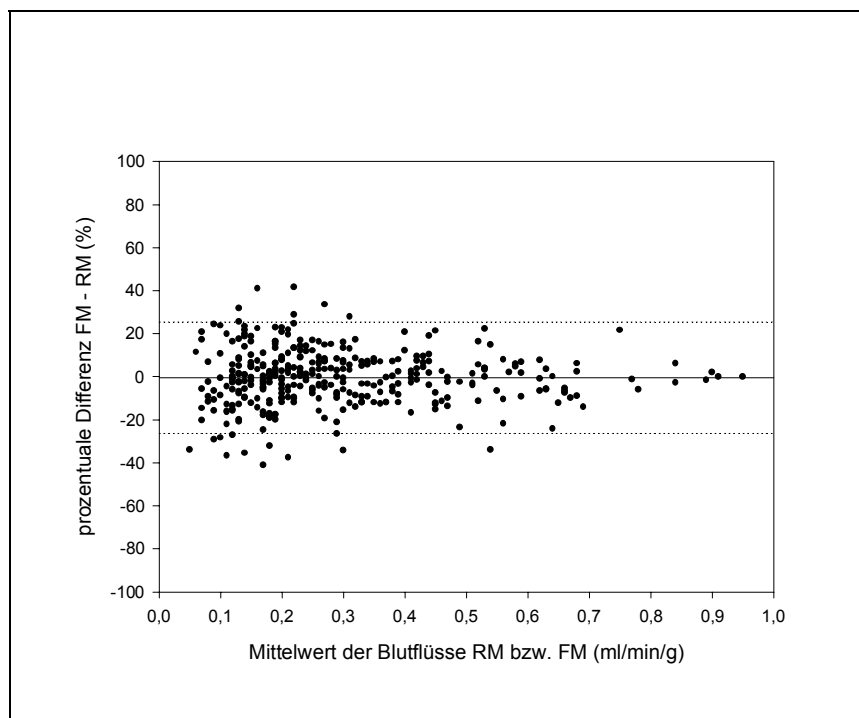


Abbildung 3-11.
Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Leber (Exp. 8).
Die FM (alle Farben) weichen im Mittel um -0,471% ($\pm 13,0\%$) ab.
95,3% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 360$

3.2.4 Regionaler Blutfluß der Niere

Allen acht Versuchstieren wurden beide Nieren entnommen. Diese wurden nach dem beschriebenen Schema jeweils in 44 Gewebestücke unterteilt. Es ergibt sich eine Gesamtzahl von 352 Nieren-Gewebeproben. Jedem Tier wurden zu 6 Zeitpunkten jeweils verschiedene FM und RM Paare injiziert. Die Gesamtzahl beträgt daher 2112 meßwertige Vergleiche zwischen RM und FM. Lediglich bei Experiment 5 wurde die Injektion der FM crimson (44 Blutflußwerte) aus der Auswertung genommen, da hier beim Transfer der Blutreferenz aus dem Szintilationsgefäß in den Filter Blut und damit eine unbekannte Zahl an FM verloren ging. 70 weitere Proben aus allen Experimenten wurden von der Berechnung ausgeschlossen, da bei diesen Proben die Mikrosphärenanzahl pro Probe unter 400 lag. Somit ergibt sich eine Gesamtzahl von 1998 Blutflußwerten, welche in die Auswertung eingingen. Die gemessenen Flusswerte sind mit den Daten aus der Literatur vergleichbar (ARRUDA et al. 1974, WARREN et al. 1975, LAMEIRE et al. 1977 und GREENFIELD et al. 1995).

Die Auswertung nach Bland und Altman ergibt eine sehr gute Übereinstimmung beider Meßmethoden. Die mittlere Abweichung variiert zwischen 1,68% und -7,44% für die einzelnen Farben. Dabei variiert die einfache Standardabweichung zwischen 8,28% und 12,7%. In dieser Darstellungsform wird für eine valide Übereinstimmung gefordert, daß 95% der Werte innerhalb der doppelten Standardabweichung liegen. Dies ist für alle Farben gegeben.

Die Korrelationskoeffizienten (r^2) für die einzelnen Experimente und Farben liegen zwischen 0,93 und 0,99.

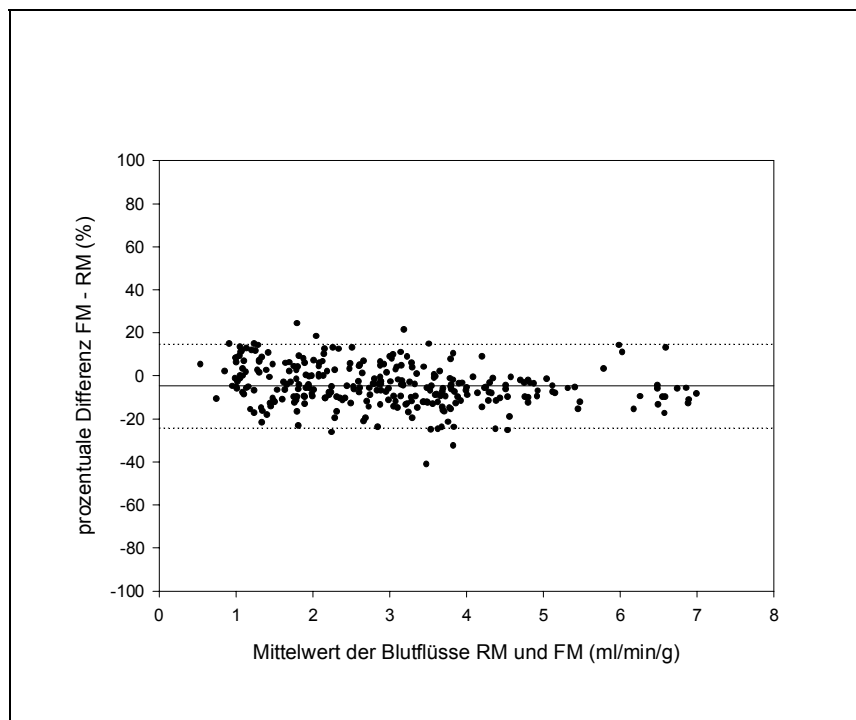


Abbildung 3-12.

Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8). Die FM (blue) weichen im Mittel um -4,71% ($\pm 9,71\%$) ab.

97,7% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

$n = 344$

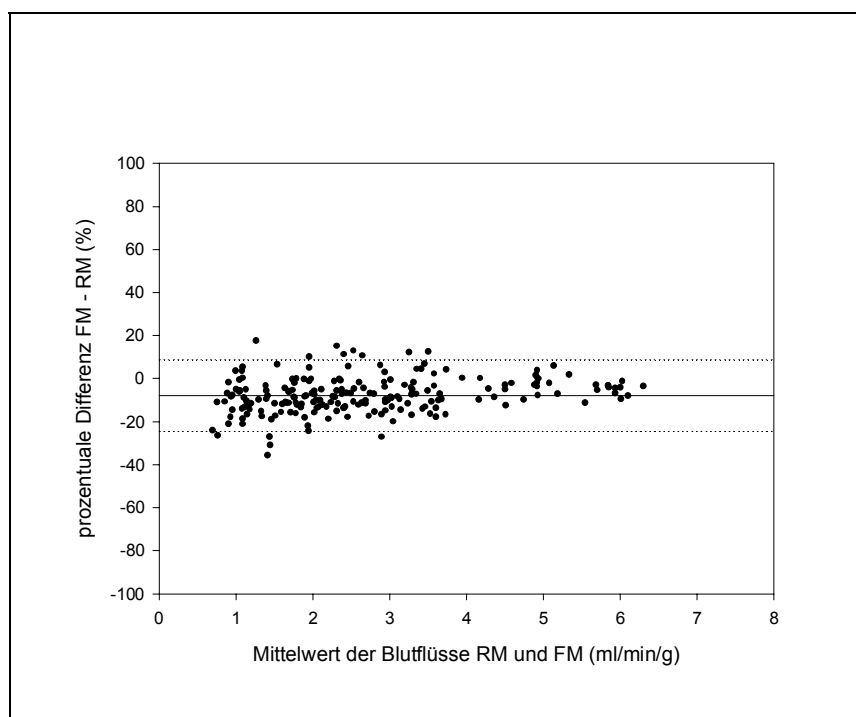


Abbildung 3-13.

Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8).

Die FM (bluegreen) weichen im Mittel um -7,44 % ($\pm 8,28\%$) ab. 97,7% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

$n = 258$

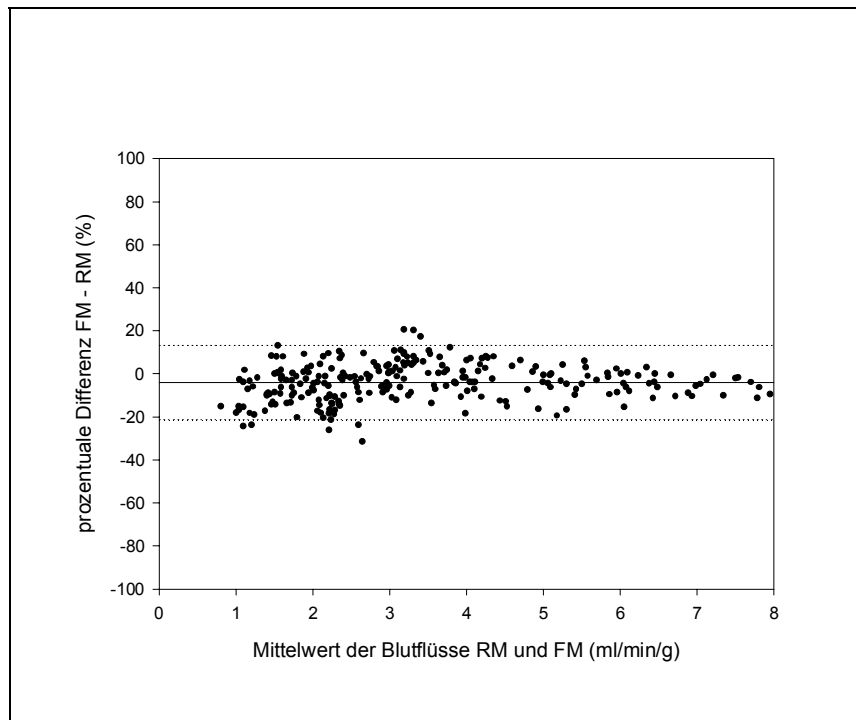


Abbildung 3-14.

Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8). Die FM (yellowgreen) weichen im Mittel um -4,13% ($\pm 8,62\%$) ab.

97,0% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

$n = 256$

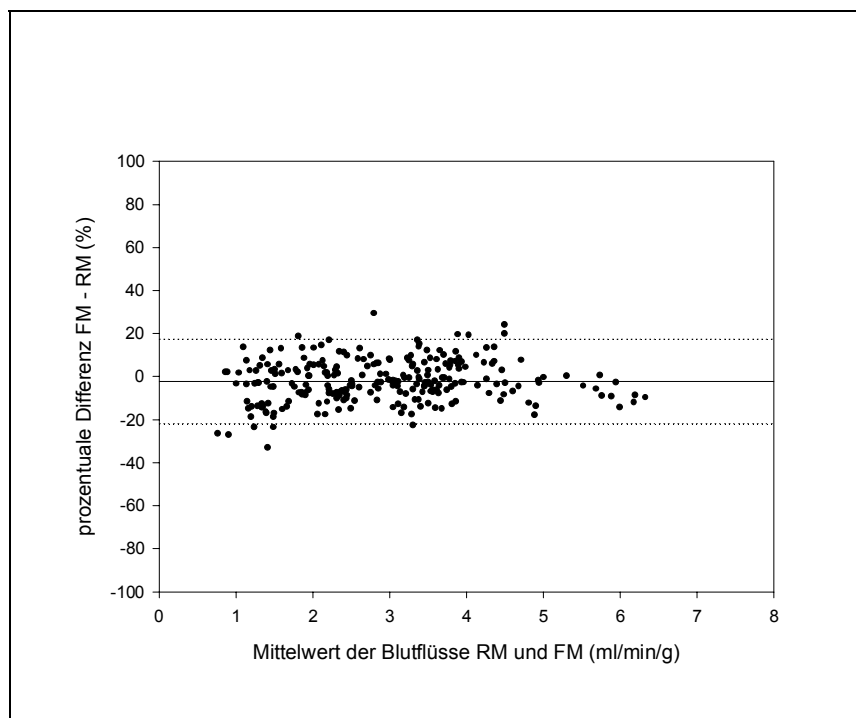


Abbildung 3-15.

Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8).

Die FM (orange) weichen im Mittel um -2,83% ($\pm 9,56\%$) ab. 95,8% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

$n = 294$

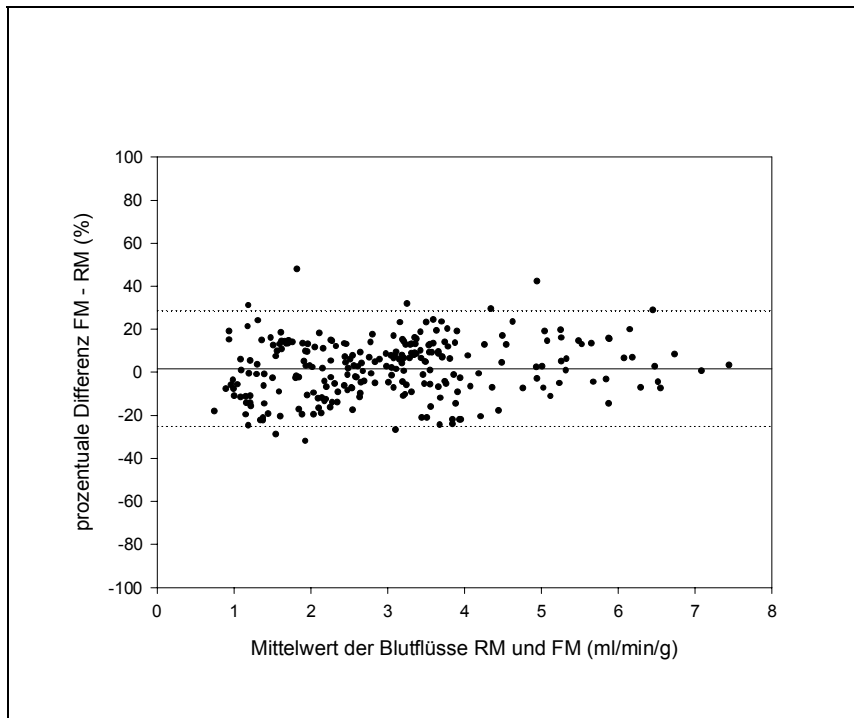


Abbildung 3-16.
Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8). Die FM (red) weichen im Mittel um 1,68% ($\pm 13,4\%$) ab. 97,0% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 257$

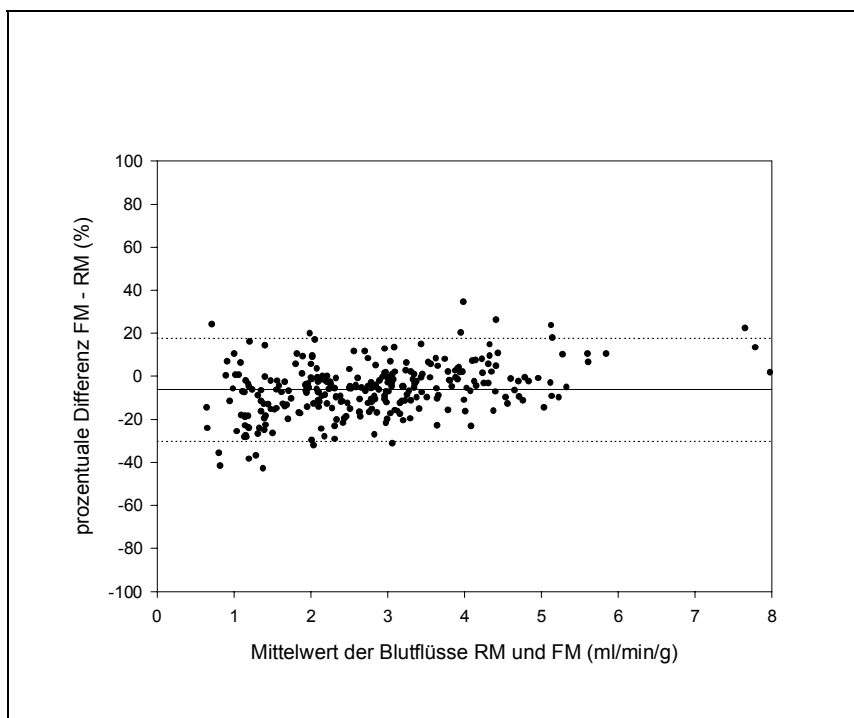


Abbildung 3-17.
Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8). Die FM (crimson) weichen im Mittel um -6,2% ($\pm 12,7\%$) ab. 96,1% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.
 $n = 249$

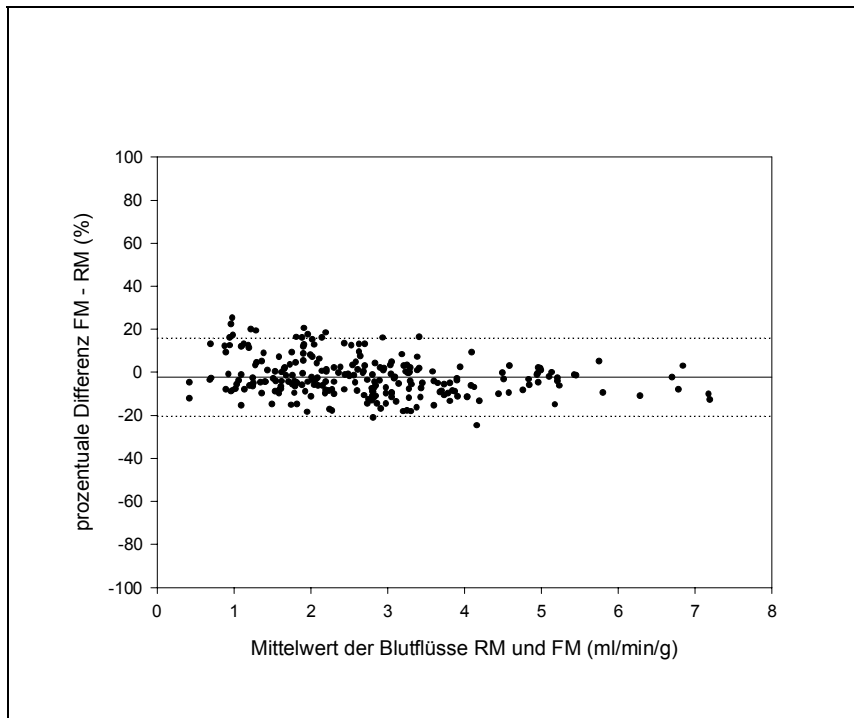


Abbildung 3-18.

Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8).

Die FM (scarlet) weichen im Mittel um -2,73% ($\pm 9,04\%$) ab. 95% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

$n = 340$

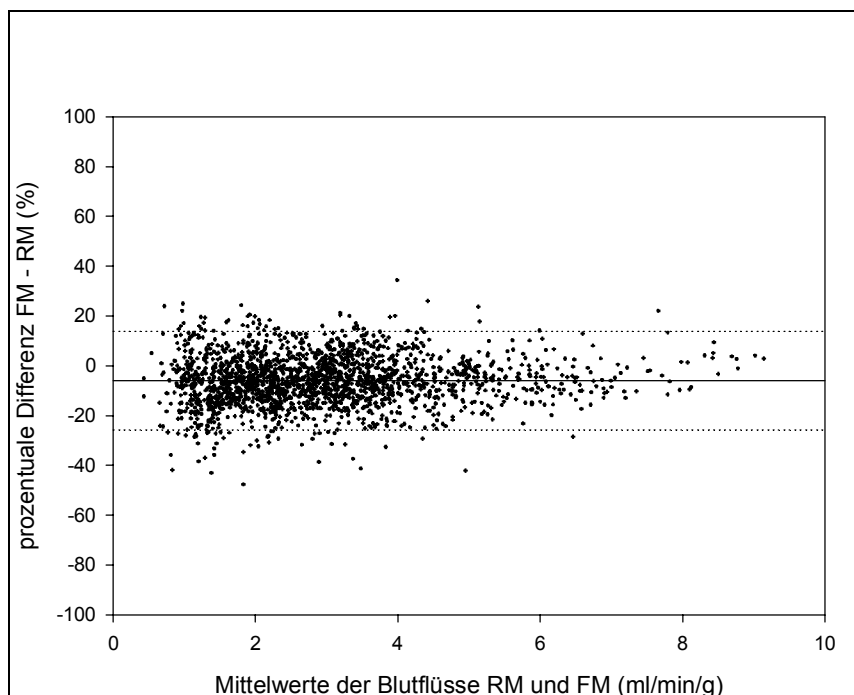


Abbildung 3-19.

Darstellung nach Bland und Altman der mit FM und RM ermittelten Blutflußwerte der Niere (Exp. 1-8). Die FM (alle Farben) weichen im Mittel um -6,0% ($\pm 9,9\%$) ab.

96,4% der Werte liegen innerhalb der doppelten Standardabweichung.

$n = 1998$

3.2.5 Qualitätskontrolle

Die in allen Experimenten mitgeführten Kontrollgruppen wiesen in keinem Experiment einen signifikanten Unterschied zu ihren Referenzgruppen auf. In Abbildung 3-20. sind exemplarisch die Ergebnisse einer Qualitätskontrolle von Experiment 6 als Boxplot dargestellt. Die hier verwendete Farbe war crimson. Diese wurde nicht zur Blutflußmessung verwendet.

Die Ergebnisse sprechen für eine valide Probenverarbeitung mit einem hohen Maß an gleichbleibender Qualität.

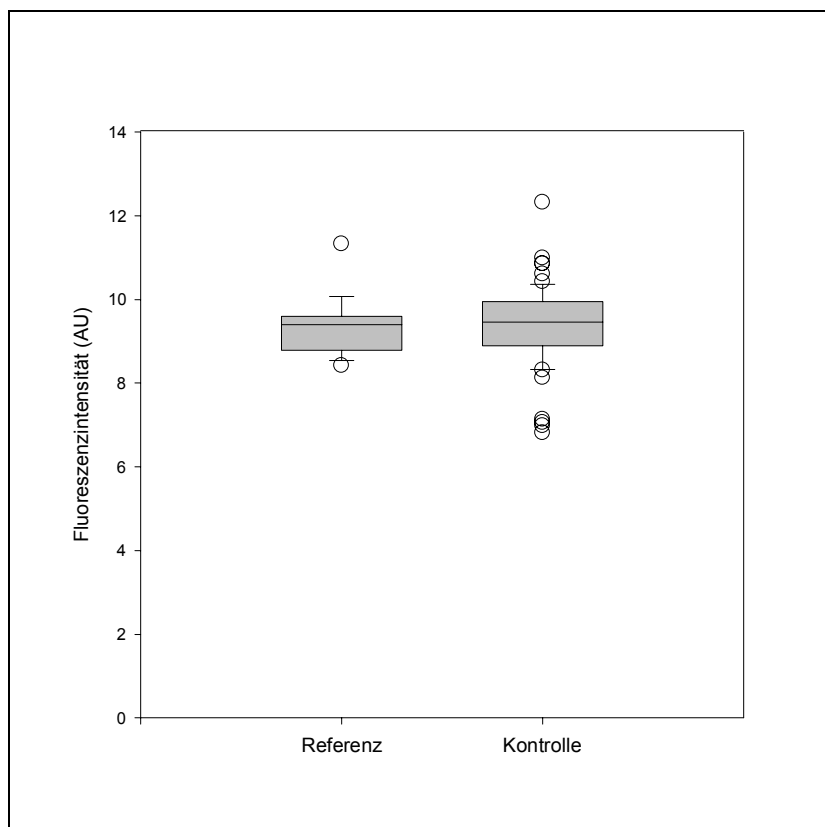


Abbildung 3-20
Boxplotgegenüberstellung
der Referenzgruppe
($9,32 \pm 0,74$; $n=30$) mit der
Kontrollgruppe
($9,38 \pm 0,98$; $n=100$) zur
Qualitätssicherung (Exp.
6, crimson). Es besteht
kein signifikanter
Unterschied ($p=0,55$)

4 Diskussion

4.1 Ziel der Arbeit

RM gelten als Goldstandard zur Messung der regionalen Organdurchblutung. Diese Methode wurde erstmals von BUCKBERG et al. 1971 und RUDOLPH und HEYMAN 1967 vorgestellt. Auch am Institut für Chirurgische Forschung (ICF) ist diese Methode verwendet, validiert und verbessert worden (SCHOSSER et al. 1979). Um die Nachteile der RM zu eliminieren und trotzdem vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde beschlossen, die Mikrosphären-Methode an sich weiter zu verwenden und nur auf eine andere Tracer-Substanz umzusteigen. Mikrosphären mit Farben im sichtbaren Bereich des Wellenspektrums waren aus folgenden Gründen nicht geeignet: Die aus den MS gewonnenen Farbstofflösungen besitzen keine scharfen Spektren und sind deswegen in einer Farbstoffmischung nur sehr schwierig voneinander zu trennen (Spillover-Effekt). Die Folge ist, dass nur eine relativ geringe Zahl (bis zu 4) von Farben in einem Experiment gleichzeitig eingesetzt werden kann. Zur Farbstoffauslösung eignen sich außerdem nur stark toxische und kanzerogene Lösungsmittel. Strenge Arbeitsschutzvorrichtungen erschweren somit die Verarbeitung der Proben. Deswegen fiel die Wahl auf fluoreszenzfarbstoffmarkierte Mikrosphären.

Da aber der Prozeß der Probenverarbeitung bei der Verwendung dieser Mikrosphärenspezies mit Fehlermöglichkeiten behaftet und sehr arbeitsaufwendig ist, war es das Ziel unserer Arbeit, die bestehenden Verarbeitungsprotokolle zu modifizieren, zur Automatisierung ein Robotersystem zu entwerfen und den gesamten Prozeß zu validieren.

4.2 Mikrosphären

Zur Messung der Organdurchblutung mittels der Mikrosphärenmethode müssen 6 Punkte Beachtung finden (modifiziert nach WAGNER et al., 1969):

- homogene Verteilung der MS im Blutstrom
- Verhalten der MS im Blutstrom
- komplette Extraktion der MS in der präkapillären Strombahn
- Verbleiben der Mikrosphären in den Arteriolen
- Beachtung von Artefakten
- Meßgenauigkeit

4.2.1 Homogene Verteilung

Eine Grundvoraussetzung jeder Bestimmungsmethode, die mit Tracern arbeitet, ist die homogene Verteilung des Tracers im Medium. Dies trifft z.B. für die HZV-Messung mittels Thermodilution genauso zu wie für die Mikrosphärenmethode. Bei der korpuskulären Suspension muß diese Homogenität zum einen im Injektat und zum anderen im Blut gewährleistet sein.

Im Injektat wird diese homogene Verteilung durch die im Methodikteil beschriebene Aufbereitungsroutine erreicht. Dies zeigt der sehr geringe Anteil an Doublets und Triplets, welche im Durchflußzytometer nachgewiesen werden konnten, deutlich. Allerdings wird diese ideale Suspension nicht für einen längeren Zeitraum bestehen, da die Mikrosphären bereits nach kurzer Zeit wieder sedimentieren. Als ideal hat sich zur Injektion das bereits beschriebene Glasgefäß erwiesen, da hierin die Mikrosphären während der gesamten Injektionsdauer durch Schütteln in Suspension gehalten werden können.

Nach der Injektion müssen sich die Mikrosphären homogen mit dem Blut vermischen. Einen sehr guten Mischeffekt hat eine turbulente Strömung, wie sie z.B. an Herzklappen auftritt. Der ideale Injektionsort ist somit die Herzhöhle. Ob es einen Unterschied zwischen der Injektion in den Vorhof oder in die Kammer des Herzen gibt haben BUCKBERG et al. (1971) untersucht, indem sie in Experimenten an Schafen und Hunden zentrale (Aorta) und periphere (A. femoralis) Entnahmeorte untereinander paarweise verglichen. Bei Injektion in den linken Ventrikel zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen herznahen und herzfernen Entnahmeorten für die arterielle Referenzprobe (A. carotis, A. femoralis und Aorta abdominalis). Dieser Unterschied trat bei der Injektion in das linke Atrium nicht auf. Aus diesem Grund ist das linke Atrium als Injektionsort zu fordern, wie es auch in unseren Experimenten erfolgte.

Ein indirekter Hinweis auf eine homogene Verteilung im Blut ergibt sich aus der histologischen Aufarbeitung von Gewebeproben nach Mikrosphäreninjektionen. In feingeweblichen Schnitten von Organen mit hoher Durchblutungsrate konnte nach wiederholter Injektion von Mikrosphären verschiedener Farbe auch Blutgefäße mit mehreren FM nachgewiesen werden. Diese sind wie an einer Kette aufgereiht. Jedoch findet man sehr selten FM der gleichen Farbe hintereinander (GLENNY et al. 1993 und BROWN et al. 1995). Dieses Phänomen der Reihenbildung veranschaulicht außerdem, daß die Blutgefäße durch Mikrosphären-embolisation nicht vollständig verlegt werden, sondern immer noch perfundiert sind.

4.2.2 Verhalten im Blutstrom

Sind Mikrosphären homogen im Blut verteilt, so ist die nächste Voraussetzung, daß sie im Blutstrom bleiben und nicht von diesem separiert werden. Zwei Eigenschaften der Mikrosphären sind hierfür hauptsächlich verantwortlich. Zum einen ist die physikalische Dichte der fluoreszierenden Mikrosphären der Blutdichte angeglichen. Zum anderen befindet sich der Durchmesser der Sphären im Größenbereich der Blutzellen. Über das Verhalten von zellulären Blutbestandteilen haben u. a. BURTON 1966 und SCHMID-SCHÖNBEIN et al. 1980 berichtet. BURTON (1966) beschrieb den Einfluß von Aussehen und Größe von Erythrozyten auf deren Verhalten in der Mikrozirkulation. SCHMID-SCHÖNBEIN et al. (1980) betrachteten Erythrozyten und Leukozyten im kapillären Netzwerk.

Nach OFJORD et al. (1981, 1983 und 1986) ist das Verhalten der Mikrosphären den Blutzellen umso ähnlicher, je näher die Größe der Blutzellen erreicht wird. In seinen Vorexperimenten zur Messung der Mikrozirkulation der Niere betrachteten OFJORD et al. eine Aufzweigung einer Arteriole. Er bestimmte den Hämatokrit und die Mikrosphärenkonzentration vor und nach der Aufzweigung. Die Gruppe kam zu dem Ergebnis, daß Mikrosphären, wie sie in unserem Experiment verwendet werden (15 µm), sich annähernd wie Erythrozyten im Blutstrom verhalten.

Diesen Befund hatten auch bereits 1977 HEYMAN et al. in einem In vivo-Experiment bestätigt. Sie zeigten, daß Mikrosphären zwischen 8 und 15 µm sich ideal im Blutstrom verteilen. Dies ist die Voraussetzung, um auch die Durchblutung in kleinen Organregionen untersuchen zu können. In ihrem Experiment bestimmte sie mit der Mikrosphären-Methode u.a. die endo- und epikardiale Durchblutung am Herzen und deren Verhältnis zueinander.

Je kleiner die Mikrosphären sind, desto homogener ist deren Verteilung im Blutstrom. Dies konnten die oben genannten Autoren hinlänglich beweisen. Allerdings ist in Richtung kleiner

Radien eine Grenze gesetzt: zum einen waren die technischen Möglichkeiten zur Herstellung noch kleinerer Kunststoffkügelchen noch nicht entwickelt und zum anderen fließt eine gewisse Anzahl von Mikrosphären durch die Organe (Shunt), wenn der MS-Durchmesser unter $10\mu\text{m}$ liegt. BASSINGTHWAIGHTE et al. haben 1990 mit molekularen Mikrosphären ($MS < 1\mu\text{m}$) experimentiert. Sie berechneten die myokardiale Durchblutung. Hierbei betrachteten sie das Herz als ein fraktales Gebilde und bewiesen, daß eine Messung mit einer Dynamik in Zeit und Ort möglich ist. Für diese Messung muß jedoch eine sehr hohe Anzahl an Sphären injiziert werden. Molekulare Mikrosphären eignen sich für eine derart große Menge (ca. 10^7) am besten. Im Vergleich mit Mikrosphären üblicher Größe zeigte sich, daß molekulare Mikrosphären Bereiche mit hoher Durchblutung eher überschätzen und umgekehrt.

4.2.3 Komplette Extraktion

BASINGTHWAIGHTE et al. (1990) nahmen diese Überschätzung in Kauf. Allerdings war damit zu rechnen, daß mit der Dauer des Experimentes auch die Rezirkulation der Mikrosphären zunahm. Von idealen Mikrosphären erwartete man also nicht nur die homogene Verteilung im und mit dem Blut, sondern auch die vollständige und dauerhafte Retention im arteriellen Schenkel des Blutkreislaufes.

Dieser Frage gingen erstmals RUDOLPH und HEYMAN 1967 nach. Sie injizierten zunächst $50\mu\text{m}$ große Mikrosphären in die V. cava und verglichen dann die Gesamtradioaktivität der Lunge und der injizierten Sphären. Es zeigte sich, daß über 99% der Sphären in der Lunge zurückgehalten wurden. Im zweiten Experiment wurde die Retention der MS im arteriellen Teil des Blutkreislaufes getestet. Hierzu wurden abermals $50\mu\text{m}$ Mikrosphären in die Aorta descendens injiziert. Da in den Lungen keine Radioaktivität gefunden wurde, folgerten die Autoren, daß die Mikrosphären vollständig im arteriellen Teil des Blutkreislaufes verblieben waren.

Dieses Ergebnis konnten NEUTZE et al. 1968 für den arteriellen Schenkel der Zirkulation bestätigen. Auch diese Gruppe verwendete 50 µm große Mikrosphären und konnte zeigen, daß im venösen Blut (Entnahmestelle: V. cava cran. und caud.) weniger als 1% der arteriell injizierten Mikrosphären zu finden waren. Diese Versuche führten sie unter hypo- und hypertonen Kreislaufbedingungen durch.

Aus den erwähnten Forderungen geht hervor, daß die Mikrosphären möglichst klein sein sollten. Deshalb wurde nun versucht, die kleinstmögliche Größe mit einem vertretbaren Shunt zu finden. UTLEY et al. untersuchten 1974 die Myokarddurchblutung mit unterschiedlich großen Mikrosphären (<10 µm (davon 40-80% < 7µm), 7µm, 9 µm, 15 µm, 25 µm). Zum einen wurde nach Injektion in das linke Atrium unter Verwendung einer arteriellen Referenz (A. femoralis) die regionale Organperfusion im Herzen bestimmt. Hierzu wurden alle Größen simultan injiziert. Zur Unterscheidung waren die verschiedenen Chargen jeweils mit unterschiedlichen Nukliden versehen. Zum anderen wurde die Shuntrate durch das Myokard mit einer venösen Referenzprobe bestimmt, welche aus den Sinus coronarius gewonnen wurde. Die Beziehung zwischen Shuntrate und Mikrosphärengröße ist in Tab. 4-1. wiedergegeben:

Mikrosphärengröße	Shuntrate
< 10 µm	27,60%
7 µm	6,30%
9 µm	1,10%
15 µm	1,10%
25 µm	0,40%

Tabelle 4-1. Beziehung zwischen Shuntrate und MS-Durchmesser nach UTLEY et al., 1973

Aufgrund dieser Ergebnisse empfahlen UTLEY et al. eine Mindestgröße von 7µm.

In der Folgezeit wurden Shunraten unter pathologischen oder medikamentösen Einflüssen untersucht. So untersuchten MARSHALL et al. 1976 am Herzen und UTLEY et al. 1980 an der Niere die Shuntrate nach ATP-induzierter Vasodilatation. Es zeigte sich, daß am Herzen 2,5% (15 µm Mikrosphären) bzw. 13,5% (9 µm Mikrosphären) der injizierten Mikrosphären

im venösen Blut (Sinus coronarius) nachgewiesen werden konnte. In der Niere konnte nur bei Verwendung der 9 µm Mikrosphären ein Anstieg der Shuntrate festgestellt werden, nicht jedoch bei 15 µm Mikrosphären.

Ebenfalls am Herzen von Hunden untersuchten CRYSTAL et al. 1979 das Verhalten von 9 und 25 µm Mikrosphären. Als Variablen wurden der arterielle Druck (90 und 150 mmHg), der koronare Perfusionsdruck (zwischen 97 und 177 mmHg) und die F_iO_2 (21% und 100%) gewählt. Es ergab sich kein signifikanter Shunt für 25 µm Mikrosphären unter allen Versuchsbedingungen. Jedoch kam es zu einer deutlichen Shuntzunahme bei den 9µm Sphären bei erhöhtem Blutdruck. Keinen Einfluß hatte die inspiratorische Sauerstoffkonzentration.

In mehreren Organen (Cerebrum, Myokard, Lunge, Niere, Jejunum, Leber und Milz) wurde das Shuntverhalten von 9 und 15 µm Mikrosphären von FAN et al. 1979 untersucht. Es wurde eine Messung unter physiologischer Bedingung und unter hyperkapniebedingter Vasodilatation durchgeführt. Die Shuntrate der Mikrosphären wurden mit Hilfe organnaher venöser Katheter (V. pulmonalis, V. renalis, V. porta, Sinus coronarius und Sinus sagittalis) und eines arteriellen Katheters (Aorta thoracalis) bestimmt. Das Verhältnis der Radioaktivität zwischen arterieller und venöser Blutprobe wurde als Shuntrate angenommen. Es zeigte sich, daß bereits unter physiologischen Bedingungen für die 9 µm Sphären eine höhere Shuntrate (bis 5 % je nach Organ) als für 15 µm Sphären besteht. Diese steigt unter Hyperkapnie bei den 9 µm Mikrosphären auf bis zu 17 % an, ändert sich aber bei den 15 µm Sphären nicht signifikant. Lediglich im Gehirn zeigt sich kein Anstieg der Shuntrate unter Hyperkapnie für die 9 µm Mikrosphären. Ebenfalls 9 µm Mikrosphären verwendeten GELMAN et al. 1984 bei der Untersuchung der Mikrosphärenretention im Darm.

Ob die für In Vivo-Experimente notwendige Medikamente wie Injektionsnarkotika, volatile Narkotika, Muskelrelaxantien und Opiate die Mikrosphären-Methode beeinflussen, wurde von CONSIGNY et al. 1982 untersucht. Das Ergebnis war, daß der Verlust an Mikrosphären im

Herzen unter Halothan-Narkose deutlich höher (bis 11,6%) ist als unter einer balanzierten Narkose unter Verwendung von Lachgas (bis 6%).

4.2.4 Verbleiben der Tracer

Während eines Experimentes mit Mikrosphären werden in der Regel repetitive Messungen der regionalen Organdurchblutung durchgeführt. Da sich ein derartiges Experiment über mehrere Stunden erstreckt, stellt sich die Frage, ob die Mikrosphären im Gefäßbett auf Dauer festgehalten werden oder ob sie aus diesem auch wieder ausgeschwemmt werden.

Ein spätes Shunting der Sphären wurde 1979 von CRYSTAL et al. untersucht. Nach der Injektion der Sphären im oben erwähnten Experiment wurde der koronare Perfusionsdruck über 30 min hinweg zwischen 100 und 200 mmHg mehrmals alterniert. Während dieser halben Stunde wurde aus dem Sinus coronarius Blut entnommen, um die Anzahl der wieder freigelassenen Sphären zu bestimmen. Bis zu 9,3% der bereits festgehaltenen Sphären lösten sich wieder. Diese MS fehlen bei der späteren Messung und die Berechnung des regionalen Blufusses mit der Mikrosphärenmethode unterschätzt somit den tatsächlichen Wert.

Werden Mikrosphären in einem chronischen Experiment über Wochen hinweg repetitiv injiziert, so interessiert nicht nur der Zeitraum von einer halben Stunde nach Injektion sondern auch dieser längere Zeitraum. In dem bereits oben erwähnten Experiment von CONSIGNY et al. wurde nicht nur der Einfluß von Medikamenten überprüft, sondern auch der Verlust von Mikrosphären aus dem Gewebe. In einem Vorexperiment wiesen die Autoren zunächst nach, daß wieder freigelassene Mikrosphären vollständig in der Lunge zurückgehalten werden. Um die Shuntrate während eines Zeitraumes von Wochen bestimmen zu können, wurde die Anzahl von Mikrosphären bestimmt, die über die A. pulmonalis in die Lunge embolisiert hatten. Je nach Wahl der Narkose ergab sich hierbei der Prozentsatz von 6% bis 11,6%. Andere Autoren nutzten dieses Phänomen des Shuntens der Mikrosphären in den venösen Schenkel des

Blutkreislaufes im Akutversuch, um die Durchblutung der Lunge (BECK, 1987 und KLEEN et al. 1996) bzw. den Anteil der A. pulmonalis an der Gesamtorgandurchblutung (BERNARD et al., 1996) zu bestimmen.

Die meisten der bisher erwähnten Experimente wurden unter Verwendung von radioaktiven Mikrosphären durchgeführt. Diese sind für chronische Experimente nur bedingt geeignet. Das Problem der radioaktiven Halbwertszeit (bei den verwendeten Nukliden im Bereich von Wochen) läßt sich für die Blufußmessung, solange man in einem gewissen Zeitraum bleibt, noch mathematisch kalkulieren.

Allerdings ergeben sich noch weitere Probleme, wie VAN OOSTERHOUT et al. 1998 gezeigt haben. Sie verglichen die Verwendung von radioaktiven und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Mikrosphären. Als Versuchszeitraum wählten sie 2 Monate mit den 4 Meßzeitpunkten Versuchsende (baseline), 5 Minuten, 1 Monat und 2 Monate vor Euthanasie der Kaninchen. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde jeweils ein Paar von radioaktiven und fluoreszierenden Mikrosphären injiziert. Bei der Auswertung wurden dann die einzelnen Messungen mit der bei Versuchsende verglichen. Bei den fluoreszierenden Mikrosphären war zwar ein Trend zur Unterschätzung zu erkennen, jedoch ergab sich weder in der Korrelation noch in der mittleren prozentualen Differenz (BLAND und ALTMAN, 1986) eine signifikante Abweichung von den Ausgangswerten über alle Meßzeitpunkte hinweg. Anders dagegen bei den radioaktiven Mikrosphären: Diese zeigen nach zwei Monaten eine signifikante Abweichung von der Messung bei Versuchsende. Ebenso ergab der intermethodische Vergleich zwischen beiden Arten von MS einen signifikanten Unterschied. Dieser betrug zwischen radioaktiven und fluoreszierenden Sphären nach 2 Monaten 40,8% ($\pm 23,5\%$). Die Injektion 5 min nach Versuchsbeginn erbrachte allerdings eine nicht signifikante mittlere Abweichung von -0,5%. Dies beweist, daß im Akutversuch beide Methoden vergleichbare Resultate liefern. Im chronischen Experiment sind die fluoreszierenden Sphären den

radioaktiven jedoch deutlich überlegen. Dies führen VAN OOSTERHOUT et al. (1998) auf eine Loslösung der Nuklide von den Sphären zurück. Denn anders als bei den FM, bei denen der Farbstoff inkorporiert ist, sind die Nuklide auf der Oberfläche der Sphären aufgelagert. Erhöhte Radioaktivität nach Injektion von RM in Fäzes und Urin der Versuchstiere belegen diese These.

Auf die Tatsache, daß auch ganze Mikrosphären aus den Blutgefäßen wandern, verwiesen erstmals JUGDUTT et al. 1979. Sie injizierten Mikrosphären in den linken Ventrikel und fanden später eine große Anzahl von Mikrosphären in den parakardialen Lymphknoten. Eine Quantifizierung war leider nicht möglich. Auch konnte diese Gruppe nicht den Weg der Sphären dorthin (via Herz oder Lunge) klären. 1982 konnten auch CONSIGNY et al. in histologischen Schnitten die Evasion von Mikrosphären aus den Blutgefäßen nachweisen.

4.2.5 Beachtung von Artefakten

Nicht jedes Organ ist der Messung der regionalen Organperfusion gleich zugänglich. Grundsätzlich gilt, daß so nah wie möglich am Organ injiziert werden sollte, um die Anzahl der Mikrosphären und deren Effekte auf den Organismus möglichst gering zu halten. Andererseits ist es aber auch entscheidend, daß sich eine homogene Mischung im Blut ergibt. Diese wird am besten durch eine turbulente Strömung, wie sie z.B. an den Herzklappen entsteht, erreicht. Um schließlich auch eine arterielle Referenzprobe entnehmen zu können, ist ein genügend langes Gefäßsegment distal der Injektionsstelle erforderlich. Als optimalen Kompromiß zwischen diesen Forderungen hat sich die linksatriale Injektion mit der Entnahme der Referenzprobe aus der Aorta descendens erwiesen. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß bei einigen Organen Kapillarbetten in Serie stehen. Im nachgeschalteten Kapillarbett kann somit nur der Anteil an Sphären, der dem Shunteffekt entspricht, erwartet werden.

Dieses Phänomen tritt bei Leber und Lunge auf. Beide haben Vasa privata und Vasa publica.

Bei der Leber erfolgt die Blutversorgung zum einen über die A. hepatica, welche bei der linksatrialen Injektion gut mit Mikrosphären versorgt wird. Bei den meisten Tierspezies und beim Menschen ist aber die Blutversorgung über die V. porta anteilmäßig höher. Da ihr Blutfluß sich aus dem Abfluß des Gastrointestinaltraktes und der Milz rekrutiert, sind in ihr nur „Shuntsphären“ aus diesen Organen enthalten. MAXWELL et al. haben diesen Anteil 1981 untersucht. Sie injizierten Mikrosphären mit einer Größe zwischen 8 und 25 µm in eine Segmentarterie des Dünndarms. Aus der Vene dieses Darmabschnittes wurde dann über 8 min Blut abgenommen. Es zeigte sich eine Shuntrate von 32% für Mikrosphären kleiner als 13 µm. Bei den Mikrosphären ab einer Größe von 15 µm zeigte sich dagegen nur ein Shuntanteil von 1%.

Noch größer als bei der Leber ist der Anteil der Durchblutung aus Vasa publica bei der Lunge. Die A. bronchiales haben nur einen sehr geringen Anteil an der Blutversorgung. Ob die Shuntrate von 4% bei 15µm großen Mikrosphären ausreicht, um die Durchblutung der Lunge zu bestimmen, untersuchten KLEEN et al. 1996. Hierzu erfolgte eine sequentielle Injektion mit einer Zeitverzögerung von 30 sec für die Injektion in das linke und rechte Atrium. Die Referenzproben zur jeweiligen Flußberechnung wurden aus der Aorta abdominalis und aus der A. pulmonalis entnommen. Unter physiologischen Bedingungen zeigte sich, daß eine linksatriale Injektion vergleichbare Werte wie die rechtsatriale Injektion liefert (mittlere prozentuale Differenz: 0,8% und mittlere Streuung $\pm$ 19%). Unter einem künstlich induzierten Respiratory-Distress-Syndrom vergrößerte sich zwar dieser Unterschied, blieb aber im Rahmen des methodischen Fehlers. Allerdings merkten die Autoren an, daß pro Gewebeprobe mindestens ca. 400 Mikrosphären gefunden werden müssen.

4.2.6 Meßgenauigkeit

Die Mikrosphärenexperimente unterliegen mathematisch den Gesetzen der Stochastik. Die Gruppe um BUCKBERG hat 1971 die theoretische Grundlage hierzu zusammengefasst. Sie geht davon aus, daß eine homogene Verteilung der Sphären mit einer konstanten Dichte von n Sphären pro Mililiter Blut vorliegt. An einer Gefäßaufzweigung sollte sich auch die Sphärenanzahl direkt proportional zum Blutstrom aufteilen. Verfolgt man den Gefäßbaum weiter bis ins Kapillargebiet, so sind von n injizierten Mikrosphären nach beliebig vielen (a) Aufzweigungen (AUDET et al., 1987) noch $\frac{n}{2^a}$ Mikrosphären enthalten (unter der Annahme einer steten y-förmigen Aufteilungsfolge). Nach 20 Aufzweigungen wäre somit nur noch ca. ein Millionstel der injizierten Menge vorhanden. Da wir ca. 6×10^6 Mikrosphären in einem Experiment verwenden, ist ersichtlich, daß man in hypothetisch kleinen Meßregionen Gebiete erhält, in denen keine Mikrosphäre (= kein Fluß) zu finden ist. Die Frage, die hier von BUCKBERG et al. 1971 gestellt worden ist, war, wie hoch die Anzahl von MS/Probe sein muß, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Das zugrundeliegende mathematische Modell ist die Poisson-Verteilung. Um in dieser mathematischen Betrachtung ein Konfidenzintervall von 95% zu erreichen sind 384 Mikrosphären pro Probe notwendig. Bereits 685 MS/Probe ergeben schon ein Konfidenzintervall von 99 %.

Diese Zahl wurde 1991 in einem Experiment von ZWISSLER et al. für die radioaktive Methode bestätigt. Sie forderten eine Mindestanzahl von ca. 375. Bei dieser Anzahl an Mikrosphären errechneten sie einen methodischen Fehler von 5,8%.

4.3 In vivo Experiment

4.3.1 Injektion

Die im Experiment verwendeten Mikrosphären sind Mikrokugeln aus Polystyren. Dieser Kunststoff hat unter anderem die Eigenschaft, daß er sich elektrostatisch aufladen kann. Werden bei der Injektion Kunststoffspritzen verwendet, lagern sich die Sphären aufgrund elektrostatischer Kräfte an der Wand der Spritze an. Deswegen werden bei der Injektion Glasgefäße verwendet, wie es bereits RUDOLPH und HEYMAN 1967 vorgeschlagen haben. Dabei werden die Mikrosphären in ein Glasgefäß mit zwei Öffnungen gebracht und dann durch eine Spüllösung (physiologische Kochsalzlösung) aus dem Gefäß heraus gespült und über ein Schlauchsystem in das Versuchstier injiziert. Die Spülung mit NaCl-Lösung hat den Vorteil, daß man nahezu die gesamte Mikrosphärenmenge injizieren kann, ohne eine Luftembolie riskieren zu müssen.

Um die Mikrosphären in Suspension halten zu können, ist ein Detergens notwendig. Üblicherweise wird hierfür Tween, eine Seifenlösung, verwendet. Allerdings besitzt Tween eine toxische Eigenschaft. Üblicherweise sieht man nach Tween-Injektion einen geringen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes um ca. 2 mmHg (YIPINTSOI et al., 1973) aufgrund einer Vasokonstriktion. Dieser reversible Effekt wurde von GRUND et al. 1995 genauer im zeitlichen Verlauf untersucht. Eine Lösung des Problems wäre der Austausch von Tween gegen Dextran oder Ficoll. Diese Substanzen zeigen bei Polystyren sehr gute Coating-Eigenschaften. Allerdings werden die Mikrosphären zur Zeit nur in Tween gelöst geliefert, was einen sehr aufwendigen Prozeß der Auswaschung unter sterilen Bedingungen nach sich ziehen würde. Da der Effekt nur sehr gering ist und die Tween-Konzentration herstellerseits deutlich reduziert wurde, entschlossen wir uns, die ursprüngliche Tween-versetzte Stammlösung des Herstellers beizubehalten.

Für eine homogene Verteilung der Mikrosphären im Blut ist die Wahl des Injektionsortes wichtig. Zunächst wiesen SHIBATA und MCLEAN 1966 bei venöser Injektion (V. cava) der Mikrosphären eine homogene Verteilung in der Lunge nach. Dabei wurde der Gefäßbaum der Lunge als ein sich stetig y-förmig aufteilendes Gebilde betrachtet, welches den Gesetzen des Zufalls unterliegt. Es zeigte sich bei einer Varianzuntersuchung von einzelnen Lungengewebeproben ein homogenes Verteilungsmuster der Mikrosphären im Gewebe.

Eine peripher- oder zentralvenöse Injektion der Sphären ist jedoch nur bei der Lunge sinnvoll. KAIHARA et al. versuchten 1968 den idealen Ort für die arterielle Injektion zu finden. Sie injizierten die Sphären repetitiv linksatrial, linksventrikulär und in die Aortenwurzel. Untersuchte Organe waren Herz, Lunge, Nieren, Leber und Milz. Für alle Organe bis auf das Herz konnten sie mit einer Injektion in die Aortenwurzel reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Für das Herz zeigte sich lediglich die linksatriale Injektion als geeignet.

Daß das linke Atrium der ideale Injektionsort ist, konnten auch BUCKBERG et al. 1971 zeigen. Sie entnahmen arterielle Referenzproben aus der Aorta und einer peripheren Arterie. Injiziert wurden die Mikrosphären abwechselnd in das linke Atrium und den linken Ventrikel. Lediglich bei linksatrialer Injektion erbrachten die zentrale und die periphere Entnahmestelle der Blutreferenz übereinstimmende Ergebnisse für die Blutflußberechnung. Bei ventrikulärer Injektion war die Anzahl der Mikrosphären in beiden Proben signifikant unterschiedlich.

4.3.2 Verteilung im Blutkreislauf

PHIBBS et al. injizierten 1967 radioaktive Mikrosphären in die A. femoralis von Kaninchen. Noch während der Injektion wurden das Gefäß und das anhaftende Gewebe schockgefroren und histologisch aufbereitet. Es zeigte sich, daß die Mikrosphären sich axial in der laminaren Strömung anordnen. Die Autoren schrieben diesen Effekt der Größe und der im Vergleich zu Blut höheren Dichte der Sphären zu.

PHIBBS et al. (1967) verwendeten in ihrem Experiment mit radioaktiven Nukliden beladene Mikrosphären. Diese haben eine deutlich höhere Dichte (1,4 – 1,8 mg/dl) als fluoreszierende Mikrosphären (1,06 mg/dl). Bei der Entwicklung der fluoreszierenden Mikrosphären wurde auch Wert darauf gelegt, exakt die Dichte von Blut zu erreichen. Wie PHIBBS et al. zeigten, sind die schwereren Sphären im axialen Strom angeordnet. Allerdings mußten wir in einem unserer Experimente feststellen, daß die Gravitation dieses Strömungsverhalten durchaus verändern kann. Aus einem Katheter, der in der Aorta thoracalis plaziert war, entnahmen wir über einen Dreiwegehahn gleichzeitig zwei Blutproben mit demselben Pumpenzug (3,24 ml/min). Je nachdem, wie der Dreiwegehahn räumlich orientiert war, fanden sich in der einen oder anderen Blutprobe mehr oder weniger radioaktive Mikrosphären. Dieser Effekt sollte bei den fluoreszierenden Sphären aufgrund ihrer blutähnlichen Dichte nicht vorkommen.

Das Verhalten von radioaktiven Mikrosphären an Aufzweigungen hatten BUCKBERG et al. bereits 1971 beschrieben. Sie ließen Blut mit Mikrosphären durch eine Glasröhre fließen. Diese zweigte sich in einem Y-Stück auf. Sie konnten zeigen, daß sich die Mikrosphären an der Kreuzung gleich verteilen.

4.3.3 Verbleib der Farbstoffe in den Mikrosphären

Eine wichtige Eigenschaft des Tracers in den Mikrosphären ist seine Beständigkeit. Diese ist bei den radioaktiven Mikrosphären aufgrund der Halbwertszeit der verwendeten Nuklide limitiert. Der Fluoreszenzfarbstoff dagegen ist keinem Zerfall ausgesetzt, vorausgesetzt die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Mikrosphären werden lichtgeschützt aufbewahrt. Dies wurde durch unser Langzeitexperiment bewiesen, bei dem sich auch nach 46 Tagen kein Abfall in der Fluoreszenzintensität fand. Auch hatten die Flüssigkeiten, in denen die Sphären suspendiert waren, keine meßbare Fluoreszenz aufgenommen.

Dies haben auch bereits VAN OOSTERHOUT et al. 1998 nachgewiesen. Sie lagerten die Mikrosphären zum einen in einer Kolloidlösung (Haemacell) bei 37°C, um In vivo-Bedingungen zu simulieren, und zum anderen bei -20°C über 2 Monate hinweg. (Anm.: laut Hersteller Molecular Probes™ sollen die Mikrosphären kühl und dunkel gelagert, aber nicht gefroren werden). Bei der Lagerung in Wärme lag der Fluoreszenzverlust zwischen 1,6% und 10,5% und in Kälte zwischen 0 und 12,1% je nach Farbe.

Die Beständigkeit des Tracers in den Mikrosphären hatten auch RUDOLPH und HEYMAN 1967 für die radioaktiven Mikrosphären gezeigt, als sie nachwiesen, daß die Flüssigkeit, in der die Sphären gelagert waren, keine höhere Aktivität als die Hintergrundaktivität aufwies. Allerdings konnten dann später VAN OOSTERHOUT et al. zeigen, daß in vivo über 2 Monate hinweg die radioaktiven Nuklide sich von der Oberfläche der Mikrosphären lösen können.

Über noch längere Zeiträume hinweg ist die Verwendung von radioaktiven Mikrosphären nur für wenige Nuklide geeignet, da die radioaktive Halbwertszeit ihre physikalische Haltbarkeit begrenzt. In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Nuklide, welche derzeit erhältlich sind, und deren Halbwertszeiten aufgeführt:

Nuklid und Massenzahl	Halbwertszeit in Tagen
Cadmium 109	462,6
Cerium 141	32,5
Chrom 51	27,7
Cobalt 57	271,7
Gadolinium 153	242
Indium 114	49,5
Niobium 95	34,9
Ruthenium 103	39,3
Scandium 46	83,8
Strontium 85	64,8

Tabelle 4-2. Halbwertszeiten von Nukliden der RM. Kursiv gedruckt sind die Nuklide, die bei unserem Experiment verwendet wurden (DUPONT, 1998)

4.3.4 Dissektion

Beide Sphärenspezies, FM und RM, erlauben es, die Organe gleichermaßen zu dissezieren. Allerdings bleibt die Organprobe bei der Auswertung für die radioaktive Methode intakt, während sie bei der fluoreszierenden Methode zerstört werden muß. Erfordert ein Versuchsprotokoll neben der Blutflußmessung auch histologische Untersuchungen der verschiedenen Organe, so ist dies bei den RM nach Messung der Aktivität problemlos möglich. Bei den FM ist eine Probenacquisition für die Histologie ebenfalls möglich. Dies muß aber bereits bei der Dissektion geschehen. Das Gewebestück, welches für die Histologie verwendet wird, ist dann für die Blutflußmessung verloren. Dies spielt aber nur bei kleinen Organen eine Rolle, bei denen die Grenzen der MS-Methode ohnehin meist erreicht werden.

Bei den RM muß allerdings beachtet werden, daß alle Geräte zur Herstellung des histologischen Präparates radioaktiv kontaminiert werden und dementsprechende Sicherheitsvorkehrungen zu treffen sind - Maßnahmen, die bei den FM nicht erforderlich sind.

4.3.5 Blutreferenz

Bei den ersten Experimenten unter Verwendung der radioaktiv markierten Mikrosphären konnte die Blutflußrate der einzelnen Organe und Gewebeproben nur prozentual angegeben werden. Dabei wurde (RUDOLF und HEYMAN, 1967) die gesamte Aktivität der injizierten Mikrosphären vor der Injektion (Gesamtaktivität) bestimmt und dann in Relation zur gemessenen Aktivität in der Gewebeprobe gesetzt.

Der absolute Blutfluß konnte in diesem Versuchsansatz nur geschätzt werden. Um absolute Blutflüsse in ml/min/g bestimmen zu können, verwendeten WAGNER et al. 1969 folgenden Versuchsansatz: injiziert man die Mikrosphären in das linke Herz und sind Mikrosphärenanzahl und Herzzeitvolumen bekannt, so läßt sich der Blutfluß folgendermaßen berechnen: aus

$$C_{\text{Org}} \times F_{\text{Blut}} = \text{BF} \times C_{\text{Blut}} \quad \text{und} \quad \text{HZV} = C_{\text{Inj}}/C_{\text{Blut}} \times F_{\text{Blut}} \quad \text{folgen:}$$

$$BF = \frac{C_{Org}}{C_{Inj}} \cdot HZV \quad \text{wobei gilt:}$$

BF = Blutfluß in der Gewebeprobe

C_{Org} = Konzentration der MS in der Gewebeprobe

C_{Inj} = Konzentration der injizierten MS

C_{Blut} = Konzentration der MS in der Blutprobe

HZV = Herzzeitvolumen

F_{Blut} = Pumpengeschw. der Referenzpumpe

Bei dieser Art der Berechnung muß das HZV noch zusätzlich bestimmt werden. Es ist aber aus dem oberen Ansatz gut ersichtlich, daß, falls die Konzentration in einer virtuellen Blutprobe bekannt ist, im Umkehrschluß auch das HZV errechnet werden könnte.

Die Entnahme einer Blutprobe wurde von DOMENECH et al. (1969), NEUTZE et al. (1968) und MAKOWSKI et al. 1968 beschrieben. DOMENECH et al. entnahmen eine arterielle Blutprobe mittels einer Pumpe mit konstanter Zuggeschwindigkeit von 20 ml/min. Diese Referenzblutprobe wurde während und für 15 bis 30 sec nach der Injektion aus einer peripheren Arterie entnommen. Somit liegt ein virtuelles Organ mit bekanntem Fluß vor (BUCKBERG et al. 1971). Für die Berechnung der regionalen Organperfusion ergibt sich wie oben beschrieben folgende Formel:

$$F_{Org} = \frac{F_{Art}}{Int_{Art}} \cdot Int_{Org} \cdot \frac{1}{m}$$

In unseren Experimenten wurde die Blutprobe noch über eine Zeitdauer von zwei Minuten nach der Injektion die Blutprobe entnommen. Diese Zeitspanne geht auf BUCKBERG et al. 1975 zurück. Zwar hatten sie gezeigt, daß eine kürzere Zeitdauer von etwa einer Minute ausreichend wäre, forderten aber dennoch aus Sicherheitsgründen diese längere Abnahmedauer. Ihre Ergebnisse bestätigten frühere Experimente von ARCHIE et al. 1973.

Zum Entnehmen der Referenzprobe wurde in unserem Experiment ein Katheter via A. femoralis in die Aorta abdominalis gelegt. BUCKBERG et al. (1971) hatten gezeigt, daß A. carotis, A. femoralis und Aorta abdominalis gültige Entnahmeorte sind, wenn das linke Atrium als Injektionsort gewählt wird.

Es ist ersichtlich, daß die Blutprobe die wichtigste Probe zur Berechnung des Blutflusses darstellt. Bei der Verwendung von FM war es bisher notwendig diese Probe in verschiedenen Gefäßen zu verdauen und weiterzubearbeiten. Das Überbringen von einem Gefäß in ein anderes stellt immer eine Fehlerquelle dar, da ein Verlust von Blut auch den Verlust einer unbekannten Anzahl an FM bedeuten kann. Durch die SPU ist es nun möglich, diese Probe in einem einzigen Gefäß zu verarbeiten. Die FM können ohne Verdauung durch direkte Filtration vom Blut separiert werden. Es sei hier noch angemerkt, daß Heparinisierung der Referenzblutprobe eine direkte Filtration unmöglich macht. Nur die bereits erwähnte Flüssigkeit (CPDA) oder Na-Citrat ermöglichen die Filtration.

4.4 Meßgenauigkeit

Der entscheidende Vorteil der Mikrosphärentechnik ist, wie bereits oben erwähnt, die hohe Auflösung der Meßmethode. Ein Nachteil der Methode besteht darin, daß nur punktuelle und keine kontinuierlichen Messungen möglich sind. Ziel ist es deswegen, möglichst oft hintereinander zu injizieren. Dabei wird vorausgesetzt, daß der Organismus durch die Injektion nicht beeinflußt wird, die Mikrosphären an ihrem Ort bleiben und diese bei der Auswertung dem jeweiligen Injektionszeitpunkt zugeordnet werden können.

4.4.1 Einfluß der Mikrosphären auf den Organismus

Die Mikrosphären werden durch den arteriellen Blutfluß im gesamten Organismus verteilt und bleiben aufgrund ihrer Größe im präkapillären Bereich hängen. Der Kapillardurchmesser beträgt $3,0\text{ }\mu\text{m}$ (WIEDEMANN, 1962 und FOLKOW und NEIL, 1971). Dadurch wird ein Teil der peripheren Blutgefäße verschlossen. Denkbar wäre nun ein Anstieg des peripheren Widerstandes und somit ein Einfluß auf die Makrohämodynamik.

RUDOLPH und HEYMAN haben bereits 1967 die Hämodynamik bei der Injektion von Mikrosphären überwacht. In ihren Experimenten untersuchten sie das Verteilungsmuster von Mikrosphären in Schafföten in utero, sowie Veränderung der Hämodynamik während der Injektion der Mikrosphären. Dabei wurden der arterielle und venöse Druck maternal (via Femoralgefäße) und fötal (via Umbilicalgefäße) gemessen. Zusätzlich wurden von beiden Organismen venöse und arterielle Blutgase untersucht. Trotz wiederholter Injektion von 10.000 bis 25.000 $50\text{ }\mu\text{m}$ großen Mikrosphären konnte keine Veränderung dieser Parameter beobachtet werden.

KAIHARA et al. stellten sich dann 1968 die Frage, ab welcher Menge an Mikrosphären die Hämodynamik beeinflusst wird. Allerdings konnte diese Gruppe ebenso wie die Forschergruppe um WAGNER (1969) keine Grenzdosis finden. Beide injizierten Mikrosphärenmengen, wie sie in Experimenten sinnvoll erscheinen. Wie bereits oben erwähnt, injizierten BUCKBERG et al. 1971 bis zu sechs mal 1×10^6 $50\text{ }\mu\text{m}$ große Mikrosphären und konnten dabei keine Änderung der Makrohämodynamik feststellen. Diese Ergebnisse wurden in den folgenden Jahren von mehreren Forschergruppen u.a. auch aus dem Institut für Chirurgische Forschung bestätigt (DOMENECH et al., 1968, NEUTZE et al., 1968, UTLEY et al., 1973 und 1980, CRYSTAL et al., 1979, FAN et al., 1979, CONSIGNY et al., 1982, KLEEN et al., 1996).

Lediglich eine Gruppe um YIPINTSOI (1973) hat einen geringen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes um 2 bis 3 mmHg unmittelbar nach der Injektion von $5 - 8 \times 10^6$ $10\text{ }\mu\text{m}$

Mikrosphären beobachtet. Dieser Effekt war jedoch innerhalb von 15 sec reversibel. Allerdings führten bereits YIPINTSOI et al. diesen Effekt eher auf Tween80 zurück. Dieses Detergens wird der Mikrosphären-Lösung zugesetzt, um die Sphären in Suspension zu halten.

HALES et al.(1977 und 1979) untersuchten die Auswirkung der Embolisation von Mikrosphären auf die Mikrozirkulation. Dazu führten sie intravitalmikroskopische Untersuchungen am Ohr von Kaninchen durch. Es zeigte sich, daß nach Verlegung von Arteriolen mit 15 µm Mikrosphären sich innerhalb von 30 sec Kollateralen öffneten. Somit ist diesem Experiment zufolge die Auswirkung auf die lokale Mikrozirkulation vernachlässigbar.

Eine andere Gruppe konnte dagegen zeigen, daß die Organfunktion durch Mikrosphäreninjektion beeinträchtigt wird. Bei diesem Experiment wurde vor und 45 min nach der Injektion von Mikrosphären die renale Kreatinin-Clearance bestimmt. Nach Injektion von 1×10^5 15 µm Mikrosphären ergab sich keine signifikante Änderung. Jedoch sank die Clearance nach Injektion von 2×10^5 bzw. 5×10^5 µm 25 bzw. 51 % ab (WARREN und LEDINGHAM, 1975).

Nicht die Funktion eines anderen Organes, der Leber, aber deren Sauerstoffspannung im Gewebe untersuchte MESSMER 1979 an Hunden. Er bestimmte die Sauerstoffspannung mittels Platinelektroden an der Oberfläche der Leber vor und nach Injektion von Mikrosphären. Es zeigte sich nach der Injektion ein Abfall der Sauerstoffspannung. Bei 4×10^4 bis $1,3 \times 10^5$ Mikrosphären war dieser Effekt jedoch reversibel. Repetitive Injektionen von Mikrosphärenzahlen in diesem Größenbereich führten jedoch zu einer signifikanten Beeinflussung der Leber.

In unserem Experiment zeigt sich keine signifikante Änderung der Makrohämodynamik nach den jeweiligen Injektionen. Weder das Herzzeitvolumen noch der Blutdruck (systemisch, pulmonal und zentralvenös) und der aus diesen Größen berechnete Strömungswiderstand weisen eine Änderung auf. Auch die Messung der arteriellen und venösen Blutgase (p_aO_2 ,

p_vO_2) ergab keinen Hinweis auf eine signifikante Änderung, weder der Makrohämodynamik der Lunge noch deren Gasaustausch. Somit kann auch in unserem Experiment von konstanten hämodynamischen Bedingungen über den Versuchszeitraum ausgegangen werden. Ob sich die Funktion einzelner Organe bei unseren Experimenten änderte, wurde nicht untersucht.

4.4.2 Wiederfindung der FM

Um die Konzentration der Mikrosphären im Gewebe messen zu können und sie auch dem entsprechenden Injektionszeitpunkt zuordnen zu können, ist eine Markierung mit einer Tracersubstanz notwendig. Dieser Tracer muß detektierbar sein und gibt auf Grund seiner Konzentration Rückschluss auf die Menge der in der Gewebeprobe enthaltenen Mikrosphären. Bei den radioaktiv markierten Mikrosphären ist dies relativ einfach, da die verwendeten Isotope im γ -Bereich strahlen und somit das Gewebe ohne nennenswerte Abschwächung passieren können.

Anders bei den mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Mikrosphären. Der Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht und kann somit die relativ dichte Gewebeprobe nicht passieren. Es ist somit notwendig die Mikrosphären wieder aus dem Gewebe zu retrahieren.

Dazu wird das Gewebe zerstört und ein vollständiger Zellaufschluß angestrebt. Mehrere Ansätze waren hier möglich.

Bei der Spurenelementanalyse wird ein Zellaufschluß mittels feiner Mahlwerke bewerkstelligt. Hierbei würden allerdings die Mikrosphären ebenfalls Schaden nehmen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Gewebeverdauung mittels quaternärer Ammoniumbasen. Diese greifen aber ebenfalls den Kunststoff der Mikrosphären (Latex) an.

Ein geeigneterer Weg wäre die Verwendung von Verdauungsenzymen. Die prinzipielle Durchführbarkeit dieses Verfahrens des Gewebeaufschlusses wurde von uns zwar

experimentell nachgewiesen, es ist jedoch wegen der sehr langen Verdauungszeiten (ca. 2 d) und hoher Kosten unpraktikabel.

Säuren sind zur Gewebeverdauung ungeeignet, da sie organisches Gewebe nur schlecht auflösen können und zudem viele organische Säuren (wie z. B. Essigsäure) bereits den Farbextraktionsprozeß aus den FM auslösen.

Somit war die Verwendung von Kalilauge, wie bereits in der Literatur beschrieben, die beste Methode, Gewebe für diesen Zweck aufzulösen. Sie bringt jedoch zwei Nachteile mit sich: zum einen schwimmen die Mikrosphären aufgrund ihrer gegenüber 4 M Kalilauge geringeren Dichte auf und zum anderen werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch den stark alkalischen pH-Wert nach seiner Auslösung aus den Sphären zerstört.

4.4.2.1 Spezifische Dichte von FM und Digestionsflüssigkeit

Die FM besitzen eine spezifische Dichte von 1,06 g/ml (MOLECULAR PROBES, 1996: 1,05 g/ml). Es zeigt sich, daß bereits bei einer Molarität von 1 M die FM wegen ihrer geringen Dichte auf der Kalilauge aufschwimmen. An der Flüssigkeit-Luft-Grenze, an der sich die FM sammeln, entstehen KOH-Kristalle. Dieser Kristallisationsprozeß wird durch die Wärme (60°C) bei der Digestion und durch die FM selbst, die wie Kristallisationskeime wirken, unterstützt. In die Kristalle werden FM eingeschlossen. Dies würde dazu führen, daß bei der Filtration des Digestates nicht sämtliche KOH-Rückstände entfernt werden würden. Um dieses Problem zu lösen, wurden zwei Ansätze verfolgt: entweder durch die Verwendung eines anderen Lösungsmittels die Dichte der KOH zu senken, oder durch eine Überschichtung den Kontakt zwischen KOH und Luft zu verhindern.

Als geeignetes leichtes Lösungsmittel würde sich Ethanol anbieten. Allerdings bildet Ethanol in einer höheren Molarität als 1 M innerhalb kurzer Zeit (ca. 1 h) bei einer Temperatur von 60°C einen braunen Niederschlag, der sich zu einer teerartigen Substanz entwickelt. Gleichzeitig

nimmt die lytische Aktivität gegenüber organischem Gewebe ab. Da KOH und Ethanol nicht miteinander reagieren, liegt die Vermutung nahe, daß Verunreinigungen diese ungewollte chemische Reaktion hervorrufen. Doch auch Reinigung nach DAB (Deutsches Arzneimittelbuch) mit AgNO_3 und mehrmaliges Destillieren, sowie KOH anderer Hersteller und Reinheitsgrade konnten nicht verhindern, daß sich die Lösung binnen kurzer Zeit braun verfärbte. Es sei außerdem angemerkt, daß auch die chemische Industrie (u.a. Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA) nicht in der Lage war, eine stabile ethanolische 4 M KOH herzustellen.

Die andere Möglichkeit, KOH-Kristallisation zu vermeiden, ist zu verhindern, daß die wäßrige Kalilauge mit Luft in Kontakt tritt. Dafür ist eine Flüssigkeit geeignet, die auf der Kalilauge aufschwimmt, aber nicht chemisch mit ihr reagiert. Diese Bedingung erfüllen z.B. Öle. Fettige Öle sind zwar nicht geeignet, da sie im alkalischen pH-Bereich verseifen, aber Silikonöle reagieren mit KOH nicht. Dieses Öl erfüllt zwar die oben genannten Bedingungen, ist aber nicht gut filtrierbar. Somit fiel die Wahl auf Isopropanol. Zwischen Isopropanol und wäßriger KOH existiert eine Mischungslücke, was bedeutet, daß sich beide Substanzen nicht untereinander vermengen lassen. Isopropanol bildet aufgrund seiner spezifischen Dichte mit 4 M Kalilauge einen diskontinuierlichen Dichtegradienten, wobei der Alkohol auf der Lauge schwimmt. Die FM ordnen sich aufgrund ihres spezifischen Gewichtes zwischen beiden Flüssigkeiten an.

Um auch zu verhindern, daß sich die FM an der Wand des Filters anlagern und dort aufgrund von statischen Kräften haften bleiben, wird der Lösung noch ein Detergens zugegeben. Dabei wird Tween[®] in einer Gesamtkonzentration von 0,02 % verwendet.

4.4.2.2 Fluoreszenzverlust durch nicht neutrale pH-Werte

Bei den ersten Proben, die mit der SPU verarbeitet worden sind, fiel auf, daß bei schneller Verarbeitung die meisten Werte plausibel waren. Ließ man aber den Fluoreszenzfarbstoff einige Zeit ruhen (ca. 2 h), so nahm die Fluoreszenzintensität bis auf 20% des Ausgangswertes ab. Die Proben waren also nicht mehr zu verwerten. Verwirrenderweise traf dies allerdings nicht für alle Farben zu. Eine recht gute Stabilität zeigten die blauen und grünen Fluoreszenzfarbtöne. Sie waren in ihrer Intensität auch nach 1 d meist nur um ca. 10% abgefallen. Ein Ausbleichen der Farbstoffe durch Lichteinfluß konnte ausgeschlossen werden. Somit mußte eine andere Ursache für den Verlust von Fluoreszenzintensität verantwortlich sein. Die Herstellerangaben für die Fluoreszenzfarbstoffe bezüglich des pH-Wertes besagten, daß bereits geringe Abweichungen vom neutralen pH-Wert die Zerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Folge haben kann.

Andererseits zeigten sich an der Innenwand des Filters gelb-weiße Ablagerungen. Diese erwiesen sich als Konglomerate aus KOH-Kristallen, verseiften Fetten und FM (Anm.: Die Digestionslösung hatte zu diesem Zeitpunkt noch nicht den Zusatz von Isopropanol).

Die Bildung von KOH-Kristallen konnte durch den Zusatz von Isopropanol wirksam verhindert werden. Auch konnten sich Fette in diesem Alkohol lösen, was die Verseifung verhinderte. Dennoch zeigte der Test mit Lackmus-Streifen, daß im Filter v.a. auf dem Filtergewebe noch KOH-Rückstände vorhanden waren.

Eine Titration mit Säure erwies sich als nicht praktikabel, da die Menge an benötigter Säure zu stark variierte. Somit war die naheliegende Lösung die Verwendung eines Puffers. Wir verwendeten einen Phosphatpuffer, der auf ein neutrales Milieu eingestellt ist. Der anschließende Test mit Lackmuspapier zeigt nun ein neutrales Milieu, der Filter ist damit frei von KOH-Rückständen.

Es sei hier ausdrücklich erwähnt, daß nach Angaben des Herstellers der FM (Molecular Probes) der Farbstoff nur im ausgelösten Zustand durch pH-Wert Änderungen zerstört wird. Der inkorporierte Farbstoff ist durch KOH nicht angreifbar. Dies wird erklärbar bei Kenntnis des Herstellungsprozesses. Zu Beginn des Herstellungsprozesses verfügen die FM über eine schwammähnliche Struktur und saugen den Fluoreszenzfarbstoff auf. Nach der Sättigung werden die FM in ein hydrophiles Medium verbracht, wodurch die äußeren Poren verschlossen werden. In diesem Zustand kann der Farbstoff nicht mit der Umwelt in Kontakt treten und ist somit gegenüber KOH „resistent“. Erst ein lipophiles Lösungsmittel ist wieder in der Lage die Poren zu öffnen und den Farbstoff aus den FM herauszulösen.

4.4.3 Verarbeitungsprotokolle

4.4.3.1 Farbige Mikrosphären

Radioaktive Mikrosphären galten lange Zeit als die beste Wahl zur Messung von Blutflüssen. Aus Umwelt- und Kostengründen wurde jedoch bald versucht, den Tracer der Mikrosphären zu ändern. Farbige Mikrosphären waren hierbei der erste Versuch. Allerdings ist hier die Weiterverarbeitung der Mikrosphären weitaus schwieriger als bei der RM Methode. Um die Anzahl der farbigen Mikrosphären bestimmen zu können, müssen diese aus der Organprobe zunächst zurückgewonnen und dann gezählt werden.

Die Erstbeschreiber der farbigen Mikrosphären (HALE et al., 1988) verwendeten nach mechanischer Zerkleinerung der Proben zur Digestion ein vom Hersteller nicht näher bezeichnetes Reagens. Die zerkleinerten Proben wurden dann bei 100° C gekocht. Nach der Digestion wurden die verdauten Proben in eine Zentrifuge verbracht und die Mikrosphären sedimentiert. Der Überstand wurde aspiriert und die Anzahl der Mikrosphären mit einer nicht näher bezeichneten Chemikalie im Hämozytometer bestimmt. HALE et al. injizierten in einem

Validierungsexperiment simultan radioaktive und farbige Mikrosphären. Zwar erhielten sie bei ihren Messungen sehr gute Korrelationen ($r^2 \geq 0,98$), aber die Blutflußwerte wurden durch die farbigen Mikrosphären um bis zu 39% überschätzt. Die Autoren führten diesen Unterschied auf die unterschiedliche Dichte der Mikrosphärenspecies zurück.

Auch beim nächsten Validierungsversuch durch KOWALLIK et al. 1990 zeigte sich erneut eine Überschätzung der Blutflüsse durch die farbigen Mikrosphären bei guter Korrelation von radioaktiven und farbigen Mikrosphärensorten. Zunächst hatte diese Gruppe die Farbstabilität der Mikrosphären in vitro und in vivo nachgewiesen. Dann wurde erneut eine Validierung der farbigen Mikrosphären gegen radioaktive durchgeführt. Es wurden fünf verschiedene Farben verwendet (weiß, gelb, rot, violett und blau). Diese wurden nacheinander in Simultaninjektionen mit radioaktiven Mikrosphären injiziert. Da die Weiterverarbeitung der Organproben nach dem Protokoll von HALE et al. sehr zeitaufwendig war (ca. 45 min / Probe), wurde das Protokoll von KOWALLIK et al. modifiziert. Die Digestion der Gewebestücke erfolgte nun ohne mechanische Zerkleinerung bei 72°C in einer 4 molaren Kalilauge. Die in der Digestionslösung schwimmenden Mikrosphären gewannen sie durch Filtern (Polyethylenlochmembran mit Porenweite 8 µm) zurück. Das aufwendige und fehlerlastige Zählen wurde durch ein Auslösen des Farbstoffes vermieden. Dabei lösten sie den Farbstoff in Toluol-Dimethylformamid auf. Die im Absorptionsphotometer gemessene Farbstoffkonzentration ist proportional zur Anzahl der Mikrosphären. Da die verschiedenen Farbstoffe unterschiedliche Absorptionswellenlängen besaßen, konnten die fünf Farbstoffe voneinander unterschieden werden. Für die Verarbeitung einer einzelnen Probe kalkulierten KOWALLIK et al. ca. 8-10 min. Probleme dieser Methode liegen im Filtrationsvorgang, da hier Mikrosphären verloren gehen können. Außerdem ist die Polyethylenmembran für die Filtration von Kalilauge ungeeignet, da sie durch Basen aufgelöst wird.

Die oben beschriebenen Routinen zum Wiederfinden farbstoffhaltiger Mikrosphären zeigen allerdings deutliche Nachteile:

Zum einen wird der Vorteil des Weglassens von radioaktiven Stoffen durch die Verwendung von Toluol-Dimethylformamid, einer toxischen und karzinogenen Chemikalie, erkauft.

Zum anderen ist das Protokoll zur Probenverarbeitung sehr zeitaufwendig und birgt eine Reihe von Gefahren, Mikrosphären zu verlieren.

4.4.3.2 Fluoreszierende Mikrosphären

Eine Lösung dieser Probleme wurde durch die Einführung fluoreszierender Mikrosphären erreicht. Zum einen konnte hierbei auf das hochtoxische Lösungsmittel Toluol-Dimethylformamid verzichtet werden. Zum anderen brachten neue Verarbeitungsprotokolle deutliche Zeitgewinne.

GLENNY et al. modifizierten 1993 die Verarbeitungsmethode nach KOWALLIK et al. (1991). Auch sie verdauten die Gewebeproben in einer 4 M KOH. Allerdings forderten sie eine sehr lange Digestionszeit von 24 h. Nach der Digestion wurde das Digestat mit den FM zunächst aus dem Digestionsgefäß dekantiert und unter Sog durch eine Polycarbonat -Membran (Porenweite 8 µm) filtriert. Hierbei war nicht gewährleistet, daß sicher alle Mikrosphären aus dem Digestionsgefäß gespült wurden. Ebenso konnten geringe Mengen an Flüssigkeit und mit dieser auch FM bei diesem Vorgang verschüttet werden. Die Filtermembran war nicht resistent gegenüber Kalilauge und wurde bei Kontakt mit dieser zerstört. Daß es dennoch möglich war, diese Membran zu verwenden, beruhte nach Angabe von GLENNY et al. (1993) auf der Tatsache, daß die Membran nur kurze Zeit (max. 30 sec.) in Kontakt mit KOH trat. Im weiteren Verlauf der Probenverarbeitung wurde nun der Filter mit den aufliegenden FM von der Filtrationseinheit entnommen und in ein weiteres Gefäß verbracht, wo dann die Auslösung der Farbstoffe stattfand. Auch hierbei konnten wieder Mikrosphären während des

Transportvorganges verlorengehen. Durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels (Cellosolve) wurden die Farbstoffe aus den FM gelöst. Es folgte die Bestimmung der Farbstoffkonzentration im Fluoreszenzspektrometer. Diese war wieder proportional zur Anzahl der Mikrosphären.

Diese Filtrationsmethode nach GLENNY et al. (1993) hat ihre Probleme im Dekantieren der Flüssigkeiten und im Umlegen der Filtermembrane. Hier können Mikrosphären verloren gehen. Nach CHIEN (CHIEN et al., 1995) beträgt dieser Verlust ca. 5,5%. Zwar spülen GLENNY et al. auf unsere Anregung hin die Gefäße mit einer Spüllösung (0,2% Tween) und filtrieren diese Flüssigkeit mit dem gleichen Filter und vermeiden dadurch KOH-Reste, aber eine vollständige Wiederfindung der Mikrosphären wurde nicht nachgewiesen. Die Filtermembran konnte die Flüssigkeiten mit den verdauten Organen Herz, Lunge und Niere gut filtrieren, versagte aber in unseren Experimenten bei lipophilen Geweben, was ein Problem bei Organen mit höherem Fettanteil darstellen könnte.

Alle diese beschriebenen Filtrationsmethoden haben neben dem Risiko des Verlustes auch den Nachteil des hohen Zeitaufwandes. Deshalb wurde von VAN OOSTERHOUT et al. 1995 ein vereinfachtes schnelleres Verarbeitungsprotokoll vorgestellt, die sogenannte Sedimentationsmethode. Hierbei verbleiben die Mikrosphären vom Einbringen der Organprobe bis zum Auslösen des Farbstoffes in einem Gefäß. Sie verdauten die Organproben in einer 2 M ethanolischen KOH. Da diese Lösung eine deutlich geringere Dichte aufweist als die Mikrosphären, sedimentieren diese. Durch wiederholte Zentrifugations- und Waschschrte wird die Digestionslösung zunächst gegen Ethanol ausgetauscht und dann der Überstand abpipettiert. Hierbei besteht die Gefahr, daß beim Abpipettieren des Überstandes Mikrosphären mitentfernt werden.

Die folgende Farbauslösung findet im gleichen Gefäß wie die Verdauung mittels Kalilauge statt und gleicht der Filtrationsmethode. Ist das Auswaschen des Digestates nicht akkurat gewesen,

können KOH-Rückstände bei den pH-sensiblen Fluoreszenzfarbstoffen sowohl die Intensität als auch die spezifischen Wellenlängen der Farbstoffe verändern.

Dieser Verlust an Mikrosphären respektive Fluoreszenzintensität bei beiden Versuchsbeschreibungen mag wohl bei sorgfältiger Arbeit, wie hier in den vorliegenden Validierungsarbeiten, sehr gering und bei der statistischen Auswertung nicht entscheidend sein. Allerdings muß beachtet werden, daß in der späteren Routine eine große Anzahl von Proben in kurzer Zeit verarbeitet werden und hierbei Flüchtigkeitsfehler auftreten können. Ebenso muß beachtet werden, daß die zitierten Arbeiten einen intermethodischen Vergleich darstellen, bei dem weniger Gewicht auf das Ergebnis einer Einzelprobe gelegt wird, als auf den Gesamtvergleich aller Proben, so daß wenige Proben, die fehlerhafte Ergebnisse liefern, nicht so sehr für das Gesamtergebnis ins Gewicht fallen. In einem Experiment können aber gerade diese Proben die entscheidenden sein, etwa die Blutprobe als Referenzprobe oder ein Organ mit nur geringem Gewicht, z.B. Cochlea (SUCKFÜLL et al., 1999). Die Autoren geben nicht an, wie etwaige Fehler hierbei zu kontrollieren wären.

Für die Lunge stellten GLENNY et al. ein weiteres Protokoll vor. Nach der Euthanasie des Versuchstieres wurde zunächst die Lunge mit Bronchialbaum und Trachea entnommen. Dann wurde die Lunge tracheal intubiert und durch den angelegten Druck (25 mmHg) getrocknet.

Die dehydrierte Lunge wurde disseziert und die Gewebestücke einzeln in Reagenzgläser gelegt. Das organische Lösungsmittel wurde nun ohne Digestion direkt zugegeben. Durch eine Einwirkzeit von 48 h wurde der Farbstoff aus den Mikrosphären herausgelöst. Dies war bei der Lunge möglich, da Lungengewebe für das Detergens sehr gut permeabel ist. Eine nicht vollständige Auslösung des Farbstoffes oder Zersetzungprodukte aus dem Gewebe mit Zerstörung des Farbstoffes sind hierbei die Gefahren. Ebenso ist bekannt, daß jedes Gewebe einen Anteil an Eigenfluoreszenz hat, der hier als Unbekannte miteingerechnet werden muß.

4.4.3.3 Entwicklung der SPU

Ziel unseres Protokolls war es, die Vorteile aller dieser Verarbeitungsmethoden auszunutzen und die Nachteile zu vermeiden. Gefordert ist somit einerseits die Filtrationsmethode, welche die beste Möglichkeit darstellt, die Mikrosphären aus dem Digestat zurückzugewinnen. Zum anderen soll der gesamte Ablauf in einem Gefäß stattfinden. Aus diesen beiden Überlegungen heraus entstand die Sample Processing Unit (SPU).

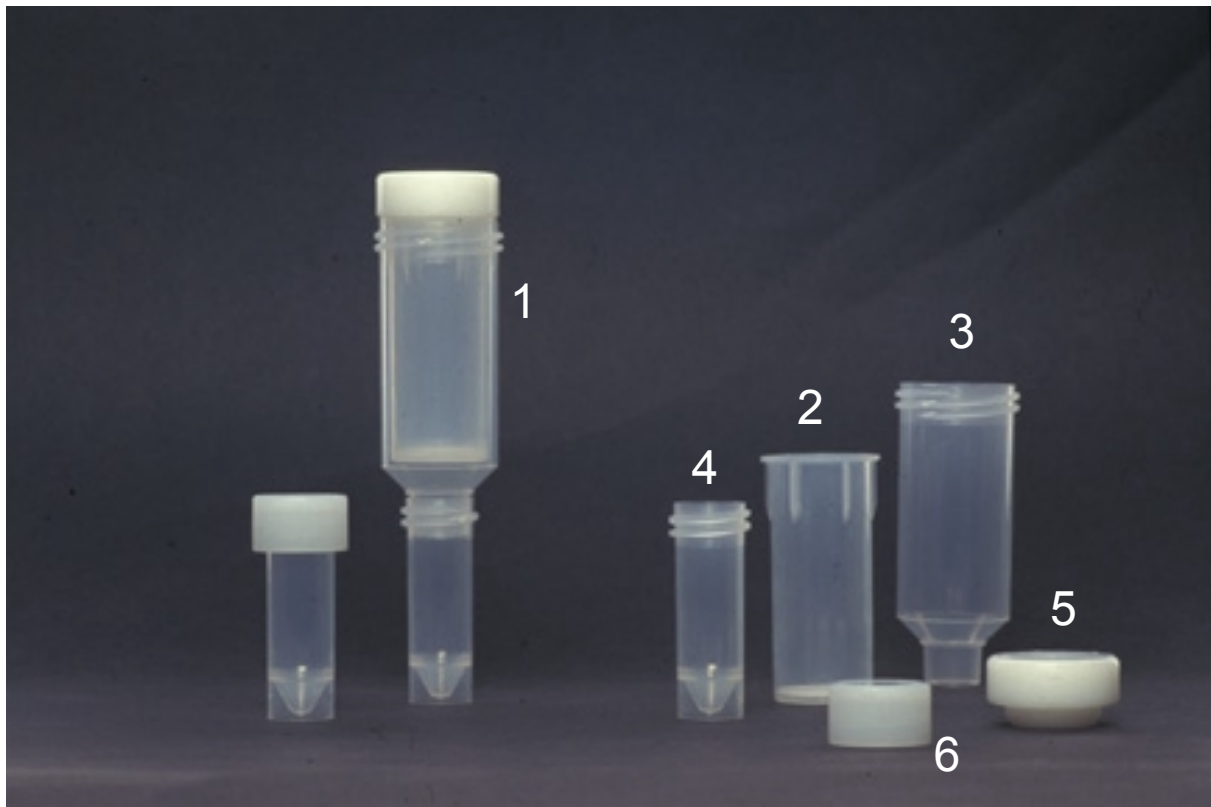


Abbildung 4-1. Die SPU (1) bestehend aus: Filter (2), Filterhalter (3), Probengefäß (4), Delrin-Deckel (5) und Deckel für Probengefäß (6)

Sie besteht aus drei Teilen: Filter, Filterhalter und Probengefäß (Abb. 4-1). Die Ausmaße dieser Teile sind so gehalten, daß Gewebestücke bis 5 g problemlos verarbeitet und sowohl die SPU als auch ihre Komponenten in handelsübliche Ständer oder Zentrifugen gestellt werden können. Dies ist auch eine Grundvoraussetzung, um die Methode mit einem Roboter automatisieren zu können. Das Herzstück der SPU ist der Filter. Hier ergaben sich auch bei der

Entwicklung die größten Probleme. Die meisten in der Literatur beschriebenen Filtergewebe sind aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht geeignet. Das Filtergewebe ist während der Prozessierung der Gewebeprobe höchstens chemischen wie auch physikalischen Belastungen ausgesetzt. Die physikalischen Einwirkungen sind: thermische Belastung von 60°C über mindestens 4 h hinweg und Scherkräfte im Filtergewebe während der Filtration mit Unterdruck oder Zentrifugation.

Die chemischen Substanzen, denen der Filter im Laufe des Verarbeitungsprozesses standhalten muß, sind folgende: Formaldehyd 5% (Fixation der Gewebeprobe), 4M KOH (Digestionsflüssigkeit), Isopropanol 100%, Phosphatpuffer (Waschflüssigkeit) und Cellosolve (organisches Lösungsmittel zum Auslösen der Fluoreszenzfarbstoffe). Wie bereits oben beschrieben, ist die von GLENNY et al. (1993) verwendete Membran nicht geeignet, in unserem Filtrationssystem Verwendung zu finden, da das Material Polycarbonat nicht resistent gegenüber Kalilauge ist. Der Versuch, Polycarbonatmembranen durch Membranen aus Polyethylen zu ersetzen, brachte das gleiche Resultat: die Membran löst sich innerhalb der 4 h Digestionszeit in KOH auf. ePTFE, ein Material, das dem bekannteren GoreTex™ (PTFE) sehr ähnlich ist, schien alle Bedingungen hinsichtlich der chemischen Eigenschaften zu erfüllen. Bei der Herstellung dieser Membran werden mittels Laserbeschuss 8 µm große Löcher in die Membran gebrannt. Leider zeigte sich, daß zum einen das Material aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft zur Filtration wäßriger Laugen ungeeignet ist. Zum anderen hielt die Membran den physikalischen Kräften, die während der Filtration auf sie einwirkten, nicht stand.

Die Lösung des Problems kam in Form eines Gewebes aus Polyamid. Polyamid, besser unter dem Namen Nylon bekannt, kann sehr hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt werden (Zugfestigkeit: 41-67 daN/mm², welche sich bei Nässe auf ca. 90% des angegebenen Wertes reduziert). Unter dieser max. Zugbeanspruchung dehnt sich das Material dann um ca. 20-35%

aus. Die Einsatztemperatur beträgt -40°C bis $+115^{\circ}\text{C}$. Es ist beständig gegenüber den oben angegebenen Chemikalien.

Eine spezielle Webtechnik mit Variierung des Kette-Schuß-Verhältnisses erlaubt Weböffnungen zwischen 1 und 10 μm . Zunächst wurde das Gewebe mittels Thermoschweißung in den Filter eingebracht. Es zeigte sich aber, daß bei dieser Vorgehensweise nicht verhindert werden kann, daß durch lokale Überhitzung das Gewebe zerstört wird. Deshalb wurde dazu übergegangen, den Filter quasi um das Polyamidgewebe herum herzustellen. Dies ist deswegen möglich, da der Schmelzpunkt von Polyamid mit $247-253^{\circ}\text{C}$ um ca. 80°C höher ist als der von Polypropylen ($165-175^{\circ}\text{C}$), dem Material, aus dem die SPU hergestellt ist. Dabei wird das Polyamidgewebe in die Spritzgußform eingelegt und dann das Polypropylen eingespritzt. Dies gewährleistet eine dauerhafte und dichte Verbindung der beiden Materialien.

4.4.3.4 Entwicklung des Verarbeitungsprotokolles

Der Verarbeitungsprozeß der Organproben im Filter kann in drei Schritte unterteilt werden: Verdauen der Organe, Reinigung des Filters und Farbextraktion. Alle drei Schritte wurden von uns neu- bzw. weiterentwickelt.

Zur Verdauung der organischen Bestandteile verwendeten wir 4 M Kalilauge. Um einen Luftkontakt und somit eine Kristallisation der KOH zu vermeiden, fügten wir eine Flüssigkeit geringerer physikalischer Dichte zu. Die Versuche begannen zunächst mit Ölen, welche aber die Tendenz zur Verseifung haben. Silikonöle zeigen dies nicht, sind aber noch relativ zähflüssig. Als beste Flüssigkeit stellte sich schließlich Isopropanol heraus. Wegen seines geringen Dampfdruckes macht dieser Alkohol allerdings den dichten Verschluß der Filter während der Digestion notwendig.

Nichtorganische Bestandteile wie die kristalline Matrix von Knochen werden durch Salzsäure vor der Verdauung entfernt. Hierzu sind je nach Knochenstärke bis zu 3 Wochen notwendig.

Unseren Ergebnissen zu Folge können alle diese Flüssigkeiten bei der Verwendung von FM eingesetzt werden.

Da der Verarbeitungsprozeß in einem einzigen Gefäß stattfindet, ist es wichtig, daß vor der Farbextraktion alle Digestatrückstände entfernt werden und ein neutraler pH-Wert erreicht wird. Deshalb wurde ein Spülschritt mit einem Phosphatpuffer eingeführt. In unseren In vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sowohl alle Rückstände entfernt werden, als auch ein neutraler pH-Wert erreicht wird.

Der Vorgang der Farbextraktion wurde in zwei Teilschritte unterteilt, um eine vollständige Extraktion zu erreichen. Im ersten Teil werden die Mikrosphären durch das lipophile Lösungsmittel „geöffnet“. Im zweiten Schritt erfolgt dann das Ausspülen der Farbstoffe.

Eine vollständige Wiederfindung der Mikrosphären wurde durch unsere in vitro Versuche bewiesen.

Dieses Protokoll verkürzt nicht nur die benötigte Arbeitszeit, sondern erreicht auch ein hohes Maß an Standardisierung. Dies ist eine Grundvoraussetzung zur Automatisierung. Wir wählten hierzu als Grundeinheit die zentrale Robotereinheit von Zymark. Dieses System wurde von uns variiert und durch neu konstruierte und selbstgefertigte Einheiten ergänzt. Das Programm zum Ablauf der Routine wurde von uns geschrieben.

4.4.4 Differenzierung der Tracersubstanzen

Die Blutflußmessung mit Mikrosphären erlaubt zwar eine hohe räumliche Auflösung, läßt im Gegenzug aber nur wenige Einzelmessungen zu. Es sind jeweils nur Momentaufnahmen eines Zustandes möglich. Um eine Dynamik des Blutflusses während eines Experimentes dokumentieren zu können, sind möglichst viele repetitive Messungen erforderlich. Da für jede

Messung eine neue Mikrosphärenspezies verwendet werden muß, ist es notwendig, daß nach Beendigung eines Experimentes jede Mikrosphäre dem jeweiligen Injektionszeitpunkt zugeordnet werden kann. Bei den radioaktiven Mikrosphären wurden verschiedene Nuklide mit unterschiedlichen Spektren der γ -Strahlung eingesetzt. Unter Verwendung mathematischer Modelle konnten bis zu 12 Nuklide (SCHOSSER et al. 1979) in einem Experiment eingesetzt werden.

Die zunächst verwendeten farbigen Mikrosphären ließen nur eine sehr begrenzte Anzahl an Farben pro Experiment zu. Dies ist eine Folge der relativ breiten Absorptionsspektren der einzelnen Farben. Eine klare Trennung der Farbgemische ist nur für drei (PRINZEN und GLENNY, 1994) Farben in einem Experiment möglich.

Bei den fluoreszierenden Mikrosphären, der Weiterentwicklung der farbigen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die ein sehr enges Maximum im Wellenlängenspektrum besitzen. Aufgrund dieser Eigenschaft können derzeit bis zu 13 Farben (SCHIMMEL et al. 2001) in einem Experiment injiziert werden. Hierzu werden noch einige Farben, die v. a. im Randbereich des Lichtspektrums liegen (z.B. infrared und darkred), entwickelt.

4.4.5 Statistische Auswertung der Tierversuche

Zum Vergleich der beiden Methoden wurde von uns eine statistische Methode verwendet, die von BLAND und ALTMAN 1986 zum ersten Mal beschrieben wurde. Die Methode zielt darauf ab, zwei unterschiedliche Meßverfahren miteinander zu vergleichen, wobei der absolute Meßwert unbekannt ist. Dabei liegt eine beliebig hohe Anzahl an Meßpunkten vor, die nicht homogen verteilt sein müssen. Zuvor wurden zum intermethodischen Vergleich meistens Korrelation und Regression verwendet. Diese beiden Parameter sind aber nach den Autoren nicht geeignet, um eine definitive Aussage über die Vergleichbarkeit zweier Methoden zu treffen. Bei dem Verfahren nach BLAND und ALTMAN können gleichzeitig „bias“ und

„precision“ bestimmt werden. Als „bias“ wird der Mittelwert der Differenzen der einzelnen Meßpunkte bezeichnet. Je größer die Abweichung von Null ist, desto schlechter ist der „bias“. Die Standardabweichung dieser Differenzen beschreibt die „precision“. Für eine valide Übereinstimmung zweier Methoden wird vorausgesetzt, daß 95% aller Werte innerhalb der doppelten Standardabweichung liegen.

Ähnliche Ergebnisse wie die hier vorgestellten Blutflußwerte der Leber und der Niere erbrachte auch die Analyse von Gewebeproben von Herz und Milz (RAAB et al. 1999 und THEIN et al. 1999 und 2002).

4.5 Reliabilität

Bei der Messung des regionalen Blutflusses mit Mikrosphären gibt es eine Vielzahl von Fehlerquellen. Fehlerhafte Proben müssen deswegen erkannt und eliminiert werden. Bereits oben wurde beschrieben, daß eine Mindestanzahl von 384 Mikrosphären pro Gewebe- oder Blutprobe vorhanden sein muß, um eine 95%ige Verläßlichkeit des Blutflußwertes zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der Mikrosphären direkt proportional zur Fluoreszenzintensität ist. Hierfür besteht eine sehr gute Korrelation ($r^2=0,99$). Aus einer Verdünnungsreihe kann die Regression bestimmt werden. Diese gibt den Proportionalitätsfaktor wieder, mit dem die Anzahl der FM pro Organprobe berechnet werden kann. Somit können die Proben mit einer zu geringen Anzahl an Mikrosphären eliminiert werden.

Die Probenverarbeitung bei der Fluoreszenzmethode ist ein zwar nun standardisierter und automatisierter Prozeß, aber auch hier sind Kontrollen zu fordern. Die beste Möglichkeit ist es, jede einzelne Probe zu überprüfen. Hierzu wird zu jeder Gewebeprobe eine bestimmte Anzahl an Mikrosphären einer Farbe, die im Experiment nicht verwendet wurde, vor der Verarbeitung zugegeben. Stimmt die gemessene Intensität dieser Farbe mit einer vorher definierten

Standardprobe überein, ist von einem fehlerfreien Verarbeitungsprozeß auszugehen. Wurden in einem Experiment alle Farben verwendet, sollte zumindest nach 50 Gewebeprobe eine Standardprobe mit Mikrosphären und einem Stück Gewebe (ohne Mikrosphären) prozessiert werden. Diese Kontrollen haben sich bei der Entwicklung unseres Systems als hilfreich erwiesen, da Fehlerquellen so leichter lokalisiert werden können. In unserem Experiment zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung dieser Kontrollen mit der Referenz.

Die SPU und die von uns entwickelte Verarbeitungsmethode wurden auch extern getestet. In dieser Testung verglichen GLENNY et al. 1997 die von ihnen entwickelte Verarbeitungsmethode mit der am ICF entwickelten. Hierfür verdauten sie Myokardanteile, welche in einem in vivo Experiment fluoreszierende und radioaktive Mikrosphären erhalten hatten. Nun setzten sie die Verhältnisse von radioaktiven Zerfällen zu Fluoreszenzemission, wie sie mit beiden Verarbeitungsmethoden erhalten wurden in Korrelation. Sie erhielten einen Korrelationskoeffizienten r^2 zwischen 0,991 und 0,995. Daraus folgerte sie, daß mit der am ICF entwickelten SPU und Verarbeitungsmethode alle Mikrosphären wiedergefunden wurden.

4.6 Arbeitsaufwand und Kosten

Bei unserem Tierexperiment wurden gleichzeitig radioaktive und fluoreszierende Mikrosphären eingesetzt. Dies läßt einen objektiven Vergleich der Kosten der beiden Methoden zu. Von den Gesamtkosten der Studie von ca. 32500 € entfielen 26000 € auf die radioaktive und 6500€ auf die fluoreszierende Methode. Bei der radioaktiven Methode entstand der überwiegende Anteil der Kosten aufgrund der Entsorgung radioaktiven organischen Materials. Der Kostenpunkt der Entsorgung ist bei der FM Methode demgegenüber vergleichsweise gering.

Etwa gleich sind die Kosten beider Methoden für den Ankauf der Mikrosphären. Bei der Verarbeitung der Proben müssen für die Fluoreszenz-Methode ca. 1,5 € pro Probe veranschlagt werden (SPU und Chemikalien).

Die Kosten für eine Neuanschaffung des Meßequipments sind ebenfalls bei beiden Methoden mit ca. 50.000 € für einen γ -Counter bzw. ein Fluoreszenzspektrometer ähnlich.

Zusätzliche Kosten ergeben sich allerdings für die Automatisierung der FM-Methode. So entstanden dem ICF für die Implementierung des gesamten Robotersystems Kosten in Höhe von ca. 125.000 €. Würde man die selbstentwickelten Komponenten und die Software in Auftrag geben, wäre mit einer Verdopplung der Summe zu rechnen. Zu bemerken ist hier noch, daß der Fluoreszenzmeßplatz dem Institut von der Fa. Perkin Elmer kostenlos überlassen worden ist.

Vom Arbeitsaufwand ist die automatisierte FM- mit der RM-Methode vergleichbar. Allerdings muß man bedenken, daß der Wartungsaufwand für das Robotersystem deutlich höher ist als für einen automatisierten γ -Counter.

5 Schlussfolgerung

Mit der von uns entwickelten SPU und dem dazugehörigen Verarbeitungsprotokoll ist es erstmals möglich den regionalen Blutfluß mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrosphären einfach und zuverlässig zu bestimmen.

Dabei mussten sich die fluoreszierenden Mikrosphären am bisherigen Goldstandard, den radioaktiven Mikrosphären, messen. Eine Reihe von Forderungen wurde deswegen an die neue Methode gestellt:

- Verarbeitung von jeglichem Organgewebe,
- Ausschluß des Verlustes von Mikrosphären durch die Verarbeitung,
- Automatisierung der Methode,
- Nachweis der Eignung in vitro,
- Nachweis der Vergleichbarkeit von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären im Tierexperiment,
- Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in einem Experiment und somit Möglichkeit der wiederholten Injektion

Alle diese Forderungen konnten bedingungslos erfüllt werden. Darüber hinaus zeigt die neue Methode folgende Vorteile:

- Möglichkeit der Qualitätskontrolle der Probenverarbeitung,
- Längere Haltbarkeit von Mikrosphären und Organproben, da FM keine Halbwertszeit aufweisen,
- Eignung der FM für chronische Tierversuche (VAN OOSTERHOUT et al. 1998),
- Niedrigere Verbrauchskosten durch Wegfall des Umgangs mit radioaktiven Stoffen,
- Keine gesundheitlichen Schäden durch Verwendung von radioaktiven Stoffen.

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß FM den RM entweder gleichwertig oder überlegen sind. FM eignen sich daher für die Durchblutungsmessung im Tierexperiment.

6 Zusammenfassung

Einleitung

Mikrosphären (MS) gelten als Standardmethode zur Messung des regionalen Blutflusses. Hierzu werden MS linksatrial injiziert. Sie verteilen sich dann im arteriellen Teil des Blutkreislaufes. Die Anzahl der in den präkapillären Gefäßen festgehaltenen MS ist direkt proportional der regionalen Organdurchblutung. Da die bisherige Markierung der MS mit instabilen Nukliden die Nachteile des Umgangs mit Radioaktivität mit sich brachte, hat man in den letzten Jahren versucht, die MS mit Fluoreszenzfarbstoffen (FM) zu beladen. Diese neue Art der Markierung erfordert allerdings, daß die FM quantitativ aus den Organproben zurückgewonnen werden müssen. Dies geschah bisher mittels Filtration oder Sedimentation. Beide Methoden bieten jedoch Nachteile.

Ziel unserer Studie war es, eine neue Methode zu entwickeln und deren Verarbeitungsprozess zu automatisieren. Dazu wurde ein Filtrationsgefäß entwickelt, das die Probenverarbeitung (Gewichtsbestimmung, Verdauung, Filtration, Spülung und Farbstoffauslösung) in einem einzigen Gefäß zuläßt und hierbei die vollständige Rückgewinnung der FM aus der Organprobe sicherstellt.

Material und Methodik:

Die von uns am Institut für Chirurgische Forschung entwickelte Sample Processing Unit (SPU) – gebrauchsmustergeschützt - besteht aus drei Untereinheiten: Filterhalter, Filter und Probengefäß.

Der essentielle Bestandteil der SPU ist der Filter, der mit einem Polyamid-Filtergewebe (Maschenöffnung 7µm) ausgestattet ist. Das von uns entwickelte Verarbeitungsprotokoll sieht folgende Schritte vor: Die Gewebeprobe wird in den Filter gelegt und das Probengewicht bestimmt. Der Filter wird dann in ein Edelstahlkochgefäß gestellt und zur Verdauung des

Gewebes werden 15 ml Digestionsflüssigkeit (4N KOH mit 0,02% Tween) und 1,5 ml Isopropanol 100% hinzugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation bei 60°C ist das organische Material vollständig aufgelöst und die FM schwimmen in der Zwischenschicht zwischen KOH und Isopropanol. Mit Hilfe von Unterdruck wird die Flüssigkeit durch das Filtergewebe filtriert. Dadurch kommen die FM auf der Membran zu liegen.

Der später von den FM ausgelöste Fluoreszenzfarbstoff benötigt ein neutrales Umgebungsmilieu. Hierzu müssen alle KOH-Rückstände aus dem Filter entfernt werden. Dies geschieht mittels eines Phosphatpuffers (29.9g K_2HPO_4 in 800ml aqua dest. vermischt mit 5.88g KH_2PO_4 in 200ml aqua dest.), der auf einen neutralen pH-Wert eingestellt ist. Mit 15 ml dieses Puffers wird die gesamte Innenfläche des Filters abgespült. Durch kurzes Eintauchen des Filters in den Puffer wird auch die Außenfläche von den KOH-Resten befreit.

Nach Trocknung des Filters durch Zentrifugation (4000 U/min für 4 min) wird der Farbstoff mit 2 ml eines organischen Lösungsmittels (2-Ethoxyethyl acetat - Cellosolve) aus den FM ausgelöst. Durch erneute Zentrifugation (4000 U/min für 4 min) wird der Farbstoff im Sammelgefäß aufgefangen und die Fluoreszenzintensität in einem Fluoreszenzspektrometer (LS50B, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) bestimmt. Die Konzentration des Farbstoffes läßt auf die Anzahl der FM rückschließen, welche wiederum direkt proportional zum Blutfluß in der untersuchten Gewebeprobe ist.

Der Proportionalitätsfaktor wird durch eine Blutreferenzprobe bestimmt, die während der Injektion der FM aus der Aorta thoracalis unter konstanter Pumpenzuggeschwindigkeit (Harvard Pump, Harvard Apparatus South Nattick, USA) entnommen wird. Diese Blutprobe kann ohne vorherige Verdauung unter Koagulationsschutz (CPDA mit dem Hauptbestandteil Citrat) direkt filtriert werden. Der Farbstoff wird mittels Cellosolve aus den Mikrosphären ausgelöst und die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Experimente

Zunächst wurden die FM und die SPU in vitro Tests unterzogen. Bei den FM wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe die Proportionalität zwischen der Anzahl der FM und der Fluoreszenzintensität untersucht. Die SPU und die dazugehörige Verarbeitungsmethode wurden einer Wiederfindungsstudie unterzogen. Dabei wurde dieselbe Anzahl von FM aller Farben in Filter und Glasröhrchen pipettiert. Die Filter durchliefen den gesamten Verarbeitungsprozeß. Das Filtrat und die Wände der Filter wurden auf die Präsenz von FM hin kontrolliert. Die Farbstofflösung, welche aus den 40 Filtern gewonnen wurde, wurde mit einer Referenzgruppe (Glasröhrchen ohne Probenverarbeitung, n=20) verglichen.

Zur in vivo Validierung der SPU erfolgten an narkotisierten Schweinen (n=8) sechs simultane Injektionen von radioaktiv markierten 15µm MS (RM) (Niob, Strontium, Scandium, Indium, Cerium und Chrom) und 15µm FM (blue, bluegreen, yellowgreen, orange, red, scarlet) zu verschiedenen Zeitpunkten. Nach der Entnahme von Leber und Nieren, wurden diese Organe nach einem vorgegebenen Schema disseziert. Der regionale Blutfluß wurde anhand der Protokolle sowohl für RM (SCHOSSER et al. 1979) als auch FM bestimmt. Zunächst wurde die Radioaktivität der Proben im γ -Counter (Canberra Packard, Frankfurt a.M., Deutschland) ermittelt. Hierauf wurde nach Verarbeitung der Organgewebe in der SPU die Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers gemessen. Der Vergleich mittels beider Methoden erhobener Meßwerte wurde mit dem Bland-Altman-Plot durchgeführt. Hierbei wird das arithmetische Mittel der Blutflüsse, die durch FM- und RM-Methode berechnet worden sind, gegen die prozentuale Abweichung der FM von den RM aufgetragen. Zur Kontrolle der Filterfunktion und der Zuverlässigkeit der Meßergebnisse wurde die gleiche Anzahl (ca. 2500 FM) einer nicht im Experiment verwendeten 15 µm FM-Spezies (crimson), sowohl in SPU-Filter (SPU-Gruppe, n = 60), als auch in 20 Glasgefäße (Referenzgruppe, n =

20) gegeben. Die SPU wurden dem gesamten Protokoll der Probenverarbeitung unterzogen, wohingegen in der Referenzgruppe lediglich der Farbstoff ausgelöst und gemessen wurde. Die Gruppen wurden mittels t-test nach Student, $p < 0,05$ untereinander verglichen.

Ergebnisse

Zwischen der Anzahl der FM und ihrer Farbstoffmenge besteht eine sehr gute Korrelation ($r^2 > 0,98$). Die Filter weisen eine Wiederfindungsrate von 100% auf. Im Eluat fanden sich keine 15µm FM; zwischen der Filtergruppe und der Referenzgruppe besteht kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität.

Es zeigt sich eine sehr gute Vergleichbarkeit beider Methoden. In den Bland-Altman Plots für die Nieren- und Leberproben wichen die Blutflußwerte mit der FM-Methode um 8,2 bis 13,4% vom mittleren Fluß (arithmetisches Mittel aus RM und FM) ab. Dabei betrug die mittlere Differenz beider Methoden zwischen -7,4% und 3,8%.

Der Vergleich der mittleren Intensitäten der Kontrollfarbe crimson zwischen der Referenzgruppe ($9,32 \pm 0,74$, $n=20$) und der SPU- Gruppe ($9,38 \pm 0,98$, $n=60$) ergab keinen signifikanten Unterschied.

Diskussion und Schlußfolgerung

Mit der SPU ist es möglich, FM vollständig aus Organproben zurückzugewinnen und dadurch den regionalen Blutfluß quantitativ zu bestimmen. Die errechneten Blutflusswerte der radioaktiven und fluoreszierenden Methoden sind miteinander vergleichbar. Somit stellen die FM eine valide Alternative zu RM unter Vermeidung der Problematik des Umgangs mit Radioaktivität dar.

Der entscheidende Vorteil der SPU ist, daß der gesamte Verarbeitungsprozeß im selben Gefäß stattfindet, und so der Verlust von FM nahezu ausgeschlossen ist. Das standardisierte

Protokoll der Probenverarbeitung mittels SPU vermindert im Vergleich zu früheren Protokollen die Bearbeitungszeit von ca. 24h bzw. 48h auf ca. 6h und reduziert die Arbeitsschritte bei denen große Präzision gefordert ist.

Das Design der SPU ermöglicht eine Automatisierung der Probenverarbeitung und somit eine Arbeitserleichterung, da die Von-Hand-Bearbeitung nur noch auf das Befüllen der SPU reduziert wird

7 Literaturverzeichnis

ABLE F. L., R. H. COOPER, and R. R. BECK. Use of fluorescent latex microspheres to measure coronary blood flow distribution. *Circ. Shock* 41: 156-161, 1993

ARCHIE J. P., D. E. FIXLER, D. J. ULLYOT, J. I. E. HOFFMAN, J. R. UTLEY, and E. L. CARLSON. Measurement of cardiac output with and organ trapping of radioactive microspheres. *J. Appl. Physiol.* 35: 148-154, 1973

ARCHIE J. P. Equations for the determination of major regional blood flow in the mammalian fetus with radioactive microspheres. *Cardiovasc. Res.* 8: 81-85, 1974

ARRUDA J. A. L., S. BOONJARERN, C. WESTENFELDER, and N. A. KURTZMAN. Measurement of renal blood flow with radioactive microspheres. *Soc. Exp. Biol. Med.* 146: 263-264, 1974

ASHLEY K. D., D. N. HERNDON, L. D. TRABER, D. L. TRABER, K. DEUBLE-ASHLEY, J. C. STOTHERT, and G. C. KRAMER. Systemic blood flow to sheep lung: comparison of flow probes and microspheres. *J. Appl. Physiol.* 73: 1996-2003, 1992

AUDET D. M., and W. L. OLBRICHT. The motion of model cells at capillary bifurcations. *Microvasc. Res.* 33: 377-396, 1987

BAISINGWAIGHTE J. B., M. A. MALONE, T. C. MOFFETT, R. B. KING, S. E. LITTLE, and K. A. KROHN. Validity of microsphere depositions for regional myocardial flows. *J. Appl. Physiol.* 253: H184-H193, 1987

BAISINGWAIGHTE J. B., M. A. MALONE, T. C. MOFFETT, R. B. KING, S. E. LITTLE, I. S. CHAN, and K. A. KROHN. Molecular and particulate depositions for regional myocardial flows in sheep. *Circ. Res.* 66: 1328-1344, 1990

BECK K. C. Regional trapping of microspheres in the lung compares well with regional blood flow. *J. Appl. Physiol.* 63: 883-889, 1987

BEDNARIK J.A., MAY, C.N. Evaluation of a Transit-Time System for the Chronic Measurement of Blood Flow in Conscious Sheep, *J. Appl. Physiol.* 78:524-530, 1995

BERNARD S. L., R. W. GLENNY, N. L. POLISSAR, D. L. LUCHTEL, and S. LAKSHMINARAYAN. Distribution of pulmonary and bronchial blood supply to airways measured by fluorescent microspheres. *Am. J. Physiol.* 80: 430-436, 1996

BLAND J. M., and D. G. ALTMAN. Statistical analyses for assessing agreement between two methods of clinical measurements. *Lancet* 1: 307-310, 1986

BROWN W. R., D. M. MOODY, D. A. STUMP, D. D. DEAL, and R. L. ANDERSON. Dog model for cerebrovascular studies of the proximal-to-distal distribution of sequentially injected emboli. *Microvasc. Res.* 50: 105-112, 1995

BUCKBERG G. D., J. C. LUCK, D. B. PAYNE, J. I. E. HOFFMAN, J. P. ARCHIE, and D. E. FIXLER. Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J. Appl. Physiol.* 31: 598-604, 1971

BUCKBERG G. D. Studies of regional coronary flow using radioactive microspheres. *Ana. Thorac. Surg.* 20: 46-51, 1975

BURTON AC. Role of geometry, of size and shape in the microcirculation. *Fed Proc* 25:1753-60, 1966

CHIEN G. L., C. G. ANSELONE, R. F. DAVIS, and D. M. VAN WINKLE. Fluorescent vs. Radioactive microsphere measurement of regional myocardial blood flow. *Cardiovasc. Res.* 39: 405-412, 1995

CONSIGNY P. M., E.D. VERRIER, B. D. PAYNE, G. EDELIST, J. JESTER, R. W. BAER, G. J. VLAHAKES, and J. I. E. HOFFMAN. Acute and chronic microsphere loss from canine left ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* 242: H392-H404, 1982

CRYSTAL G. J., R. B. BOATWRIGHT, H. F. DOWNEY, and F. A. BASHOUR. Shunting of microspheres across the canine coronary circulation. *Am. J. Physiol.* 236: H7-H12, 1979

DOMENECH R. J., J. I. E. HOFFMAN, M. I. M. NOBLE, K. B. SAUNDERS, J. R. HENSON, and SUBIJANTO. Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circ. Res.* 25: 581-596, 1968

DUPONT, Technical Data. Begleitinformation zu NEN-Trac Microspheres, Juni 1998

FAN F.-C., G. B. SCHUESSLER, R. Y. Z. CHEN, and S. CHIEN. Determination of blood flow and shunting of 9- and 15- μ m spheres in regional beds. *Am. J. Physiol.* 237: H25-H33, 1979

FICK, A. Über die Messung des Blutquantums in den Herzventrikeln. *Sitz der Physik-Med Ges Wurtzberg* 1870

FOLKOW B. und E. NEIL. *Circulation*. Oxford University Press, London-Toronto, 1971

GANS JH, D WAKEFIELD, G. KILSHEIMER. In vitro distribution of inulin and PAH in dog and sheep kidney cortex and medullary slices. *Proc Soc Exp Biol Med.* 122: 624-6, 1966

GELMAN S., D. N. Granger, K. FOWLER, and L. R. SMITH. Clearance of 9- μ m spheres and rubidium in the intestinal circulation. *Am. J. Physiol.* 247: G13-G18, 1984

GLENNY R. W., S. BERNARD, and M. BRINKLEY. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J. Appl. Physiol.* 74: 2585-2597, 1993

GLENNY R. W. Manual for using fluorescent microspheres to measure regional organ perfusion. (Veröffentlichung im WWW, ohne ISBN <http://fmrc.pulmmcc.washington.edu>) 1993

GLENNY R. W. Manual for using fluorescent microspheres to measure regional organ perfusion. Manual for the 2nd European workshop on the fluorescent microsphere method, 1-42, ICF München, 1995

GLENNY R. W. Measuring regional organ blood flow with microspheres. (Veröffentlichung im WWW, ohne ISBN <http://fmrc.pulmmcc.washington.edu>), 1996

GLENNY R. W. Perkin Elmer Filtration Units Validation Experiments. (Veröffentlichung im WWW, ohne ISBN <http://fmrc.pulmmcc.washington.edu>), 1997

GREEN J. F. Determinants of Systemic Blood Flow. In: GUYTON, A. C., YOUNG, D. B. (Hrsg.): Cardiovascular Physiology III, Vol. 18, Baltimore: University Park Press, 1979

GREENFIELD S. P., W. LEWIS, B. PERRY, J. WAN, and F. MORRIN Regional renal blood flow measurements using radioactive microspheres in a chronic porcine model with unilateral vesicoureteral reflux. J. Urol. 154, 816-819, 1995

GROSS W., R. SCHOSSER, K. MESSMER. MIC-III--an integrated software package to support experiments using the radioactive microsphere technique. Comput Methods Programs Biomed. 33: 65-85, 1990

GRUND F, H.T. SOMMERSCHILD , K. A. KIRKEBOEN , A. ILEBEKK. Cardiovascular effects of the microsphere suspending agent, Tween 80, in pigs. Acta Physiol Scand. 155: 331-2, 1995

HALE S. L., K. J. ALKER, and R. A. KLONER. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. Circulation 78: 428-434, 1988

HALES J. R. S., W. J. CLIFF. Direct observations of the behaviour of microspheres in microvasculature. Bibl. anat. 15: 87-91, 1977

HALES J. R. S., R. B. KING and A. A. FAWCETT. Observations on the validity of using „NEN-TRAC“ microspheres for measuring organ blood flow. Pflügers Arch. 379, 295-296, 1979

HEYMANN M. A., B. D. PAYNE, J. I. HOFFMAN and A. M. RUDOLPH. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. Prog Cardiovasc Dis. 20 :55-79, 1977

JUGDUTT BI, G. M. HUTCHINS, B. H. BULKLEY and L. C. BECKER. The loss of radioactive microspheres from canine necrotic myocardium. Circ Res. ;45: 746-56, 1979

KAIHARA S., P. D. VAN HEERDEN, T. MIGITA and H. N. WAGNER. Measurement of distribution of cardiac output. J. Appl. Physiol. 25: 696-700, 1968

KELLER G.: Der grüne Heinrich [Zweite Fassung], S. 911. in: Digitale Bibliothek Band 1: Deutsche Literatur, S. 109279, Berlin, 2000

KLEEN M., B. ZWISSLER, R. SCHOSSER and K. MESSMER. Determination of regional pulmonary blood flow with systemically injected nonentrapped microspheres. *J. Appl. Physiol.* 81: 695-706, 1996

KOBAYASHI N., K. KOBAYASHI, K. KOUNO, S. HORINAKA and S. YAGI. Effects of intra-atrial injection of colored microspheres on systemic hemodynamics and regional blood flow in rats. *Am. J. Physiol.* 266: H1910-H1917, 1994

KOWALLIK P., R. SCHULZ, B. D. GUTH, A. SCHADE, W. PFAFFHAUSEN, R. GROSS and G. HEUSCH. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 83: 974-982, 1991

KVIETYS P. R., A. P. SHEPHERD, D. N. GRANGER. Laser-Doppler, H₂ clearance, and microsphere estimates of mucosal blood flow. *Am. J. Physiol.* 249: G221-G227, 1985

LAMEIRE N. H., S. RINGOIRS, I. LEUSEN and J. H. STEIN. The validity of the radioactive microsphere method (RM) for the measurement of intrarenal blood flow distribution. *Bibl. anat.* 44: 60-65, 1977

MAKOWSKI EL, G. MESCHIA, W.DROEGEMUELLER and F. C. BATTAGLIA. Measurement of umbilical arterial blood flow to the sheep placenta and fetus in utero. Distribution to cotyledons and the intercotyledonary chorion. *Circ Res.* 23: 623-31, 1968

MARSHALL W. G., G. B. BOATMAN, G. DICKERSON, A. PERLIN, E. P. TODD and J. R. UTLEY. Shunting, release, and distribution of nine and fifteen micron spheres in myocardium. *Surgery*, 631-637, 1976

MAXWELL L. C., A. P. SHEPHERD, G. L. RIEDEL and M. D. MORRIS. Effect of microsphere size on apparent intramural distribution of intestinal blood flow. *Am. J. Physiol.* 241: H408-H414, 1981

MCDEVITT D. G. and A. S. NIES. Simultaneous measurement of cardiac output and its distribution with microspheres in the rat. *Card. Res.* 10, 494-498, 1976

MESSMER K. Radioactive microspheres for regional blood flow measurements. Actual state and perspectives. 10th Europ. Conf., Cagliari, *Bibl. anat.* 18: 194-197, 1979

MESCHIA G., J. R. COTTER, E. L. MAKOWSKI and D. H. BARON. Simultaneous measurements of uterine and umbilical blood flows and oxygen uptake. *Quart. J. Exp. Physiol* 52: 1, 1967

MOLECULAR PROBES. Fluospheres® Fluorescent microspheres for blood flow determination. MP 5030, Begleitinformation zu fluoreszierenden Mikrosphären, 1996

NEUTZE J. M., F. WYLER and A. M. RUDOLPH. Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *Am. J. Physiol.* 215: 486-495, 1968

NOLTE D, RAAB S, THEIN E, DRAENERT K, EHRENFELD M und MESSMER K. A new experimental model for repetitive osseous blood supply measurement. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 1999 Suppl 1:147-50.

OFJORD E. S., G. CLAUSEN and K. AUKLAND. Skimming of microspheres in vitro: implications for measurement of intrarenal blood flow. *Am J Physiol.* 241: H342-7, 1981

OFJORD E. S. and G. CLAUSEN. Intrarenal flow of microspheres and red blood cells: skimming in slit and tube models. *Am J Physiol.* 245: H429-36, 1983

OFJORD E. S. and G. CLAUSEN. Relative flow of blood cells, platelets, and microspheres in outer and inner renal cortex. *Am J Physiol.* 251: H242-6, 1986

PAPADIMITRIOU J. Experimental measurement of microcirculation in myocardial infarction by using radioactive microspheres. *Intern. Surg.* 61: 486-489, 1976

PHIBBS R. H., F. WYLER and J. NEUTZE. Rheology of microspheres injected into circulation of rabbits. *Nature.* 216: 1339-40, 1967

PRINZEN F. W., and R. GLENNY. Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurements. *Cardiovasc. Res.* 28: 1467-1475, 1994

RENEMANN R. S., A. VERHEYEN, W. VAN GERVEN, L. STIJNEN, and A. H. M. JAGENAU. The importance of size and diameter distribution of the microspheres for accurate determination of regional myocardial blood flow (MBF). *Bibl. anat.* 15: 30-34, 1977

RUDOLPH A. M. and M. A. HEYMAN. The circulation of the fetus in utero; Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ. Res.* 21: 163-184, 1967

RUDOLPH A. M. and M. A. HEYMAN. Measurement of flow in perfused organs, using microsphere technique. 4th Karolinska. Symposium, 112-114, 1971

SAPIRSTEIN L. A. Fractionation of the cardiac output of rats with isotopic potassium. *Circ. Res.* 4: 689, 1956

SCHIMMEL C., D. FRAZER and R. W. GLENNY. Extending fluorescent microsphere methods for regional organ blood flow to 13 simultaneous colors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H2496-506, 2001

SCHMID-SCHÖNBEIN G. W., R. SALAKI, S. USAMI and S. CHIEN. Cell distribution in capillary networks. *Microvasc. Res.* 19, 18-44, 1980

SCHMID-SCHÖNBEIN G. W., S. USAMI, R. SALAKI and S. CHIEN. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc. Res.* 19, 45-70, 1980

SCHOSSER R., K. E. ARFORS and K. MESSMER. MIC-II –a program for the determination of cardiac output, atrio-venous shunt and regional blood flow using the radioactive microsphere method. *Comp. Prog. Biomed. Res.* 9: 19-38, 1979

SCHOSSER R., K.-E. ARFORS and K. MESSMER. Data reduction in multiple flow measurements using the radioactive microsphere-technique. 10th Europ. Conf., Cagliari, Bibl. anat. 18: 198-200, 1979

SHIBATA H. R. and L. D. MCLEAN. Blood flow in tumors. Prog. Clin. Med., 33: 123-35, 1966

SMITS G. J., R. J. ROMAN and J. H. LOMBARD. Evaluation of laser-Doppler flowmetry as a measure of tissue blood flow. J. Appl. Physiol. 61: 666-672, 1986

SUCKFÜLL M., G. WINKLER, E. THEIN, K. SCHORN, and S. RAAB. Changes of serum osmolarity influence the function of outer hair cells. Acta Otolaryngol. 1999;119: 316-21.

SWAN H. J., W. GANZ, J. FORRESTER, H. MARCUS, G. DIAMOND and D. CHONETTE. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. N Engl J Med; 283: 447-51, 1970

UTLEY J. R., E. L. CARLSON, J. I. E. HOFFMAN, H. M. MARTINEZ and G. D. BUCKBERG. Total and regional myocardial blood flow measurements with 25 μ , 15 μ , 9 μ , and filtered 1 - 10 μ diameter microspheres and antipyrine in dogs and sheep. Circ. Res. 34: 391-405, 1974

UTLEY J. R., W. G. MARSHALL, G. B. BOATMANH, G. DICKERSON, C. B. ERNST and M. E. DAUGHERTY. Trapping, nontrapping and release of nine and fifteen micron spheres in dog kidneys. Surgery 87, 222-229, 1980

VAN OOSTERHOUT M. F. M., F. W. PRINZEN and R. S. RENEMAN. The fluorescent microsphere method for determination of organ blood flow. (Abstract) FASEB J 8: A854, 1994

VAN OOSTERHOUT H. M. M. WILLIGERS, R. S. RENEMAN, M. F. M. and F. W. PRINZEN. Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. Am. J. Physiol. 269: H725-H733, 1995

VAN OOSTERHOUT M. F. M., F. W. PRINZEN, S. SAKURADA, R. W. GLENNY and J. R. S. HALES. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. Am. J. Physiol. 275: H110-H115, 1998

WAGNER H. N., B. A. RHODES, Y. SASAKI and J. P. RYAN. Studies of the circulation with radioactive microspheres. Invest. Radiol. 4: 374-386, 1969

WARREN D. J., and J. G. G. LEDINGHAM. Measurement of intrarenal blood-flow distribution in the rabbit using radioactive microspheres. Clin. Scien. Mol. Med. 48: 51-60, 1975

WIEDEMAN M. P. Dimensions of blood vessels from distributing artery to collecting vein. Circ. Res. 12, 375-378, 1962

WIETZOREK J. FLUVO-VI Ein neues analytisches Durchflußzytometer mit universellen Eigenschaften für die medizinische Forschung. Dissertation (Fakultät Physik), LMU München, 1997

WOLF A. V. PAH- Clearance Am. J. Physiol. 133: 496-8, 1941

YIPINTSOI T., W. A. DOBBS, P. D. SCANLON, T. J. KNOPP and J. B. BAISINGTHWAIGHTE. Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. Circ. Res., 33: 573-587, 1973

ZWISSLER B., R. SCHOSSER, C. WEISS, V. IBER, M. WEISS, C. SCHWICKERT, P. SPENGLER and K. MESSMER. Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. Res. Exp. Med. 191: 47-63, 1991

8 Eigene Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Arbeit

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Filtrationsgefäßes, um den regionalen Blutfluß des Herzens mittels fluoreszierender Mikrosphären zu bestimmen. Biomed. Tech. 43(1), 538-539, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER and K. MESSMER. Validation of an automated method for recovering fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. Abstract FASEB Journal 12: 2267, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER and K. MESSMER. Validation of an automated method for recovering fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. Posterbeitrag FASEB Meeting, San Francisco, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, and K. MESSMER. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. Am. J. Physiol, H1801-6, 1999

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Filtrationsgefäßes, um den regionalen Blutfluß des Herzens mittels fluoreszierender Mikrosphären zu bestimmen Abstract, Res. Fest., München, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Filtrationsgefäßes, um den regionalen Blutfluß des Herzens mittels fluoreszierender Mikrosphären zu bestimmen. Posterbeitrag, Res. Fest., München, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, and K. MESSMER. Validation of a method for recovering fluorescent labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion of the heart. Abstract, IVR, Europ. Soc. Microcirc., Paris, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, and K. MESSMER. Validation of a method for recovering fluorescent labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion of the heart. Posterbeitrag, IVR, Europ. Soc. Microcirc., Paris, 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Filtrationsgefäßes, um den regionalen Blutfluß des Herzens mittels fluoreszierender Mikrosphären zu bestimmen. Posterbeitrag zur Jahrestagung der Ges. für BMT e. V., Sept. 1998

RAAB S., E. THEIN, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Filtersystems, um die regionale Organdurchblutung mit fluoreszierenden Mikrosphären zu bestimmen. Abstract, BMT 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER. F. MEISNER, A. PAPE und K. MESSMER. Validation of a robotic system for the determination of regional blood flow with fluorescent microspheres. Posterbeitrag, Europ. Soc. Microcirc., Paris, 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER. F. MEISNER, A. PAPE und K. MESSMER. Validation of a robotic system for the determination of regional blood flow with fluorescent microspheres. Abstract, Europ. Soc. Microcirc., Paris, 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER. F. MEISNER, A. PAPE und K. MESSMER. Validierung eines Roboters für die Bestimmung der regionalen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. Biomed. Tech., 43(1), 536-537, 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER. F. MEISNER, A. PAPE und K. MESSMER. Validierung eines Roboters für die Bestimmung der regionalen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. Posterbeitrag zur Jahrestagung der Ges. für BMT e. V., Sept. 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER. F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Roboters für die Bestimmung der regionalen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. Posterbeitrag zum Res. Fest., München, 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER. F. MEISNER, A. PAPE, und K. MESSMER. Validierung eines Roboters für die Bestimmung der regionalen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. Abstract Res. Fest., München, 1998

THEIN E., S. RAAB, A. G. HARRIS, and K. MESSMER. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of regional blood flow. Comp. Meth. Pro. Biomed 61: 11-21, 1999

THEIN E., S. RAAB, und K. MESSMER. Verarbeitung von Gewebeproben mit Hilfe der Sample-Processing-Unit unter Verwendung einer modifizierten Digestionsmethode. Begleitblatt zur SPU, Perkin Elmer, 1998

THEIN E., Bestimmung der regionalen Organdurchblutung mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären - Modifikation, Verbesserung und vollständige Automatisierung der Methode, Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät Tiermedizin, München, 1998

THEIN E, S. RAAB, A. G. HARRIS, M. KLEEN, O. HABLER, F. MEISNER and K MESSMER. Comparison of regional blood flow values measured by radioactive and fluorescent microspheres. Eur Surg Res. 34 :215-23, 2002

9 Im Rahmen dieser Arbeit geschützte Produkte

Harris, A. G., Thein, E., Raab, S.: Rohr zur Filtration, insbesondere von Mikrosphären, Patent Cooperation Treaty EP98/02293

Raab, S., Thein, E.: Gefäß zur Filtration und Trennung von Partikeln, insbesondere Mikrosphären in einer Größe von 10 µm und 15 µm, Gebrauchsmuster Nr. 29808018.4

Thein, E., Raab, S., Harris, A. G.: Rohr zur Filtration von Mikrosphären mittels Geweben mit einer Porengröße von 1 µm bis 15µm, Gebrauchsmuster Nr.: 29706998.5

10 Lebenslauf

Lebenslauf von Stephan Raab

geboren: 14.11.1970 in Miltenberg
Eltern: Dr. Hubert Max Raab, StD., und
Gabriele Annemarie Raab, geb. Haas, Lehrerin
Schulbildung: 4 Jahre Grundschule in Friedberg
9 Jahre Gymnasium in Friedberg
allgemeine Hochschulreife am 29.6.1990
Wehrdienst: Ausbildung zum Sanitäter in Würzburg
vom 1.7.1990 bis 1.11.1990 und
Sanitätssoldat in Fürstenfeldbruck
vom 1.11.1990 bis 30.6.1991
Universität: seit Wintersemester 1991/92 an der
Medizinischen Fakultät der LMU in München
ärztliche Vorprüfung am 1.9.1993
erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 16.9.1994
zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 11.4.1997
dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 22.4.1998
Erlaubnis für die Tätigkeit als AIP
Ärztliche Tätigkeit: AIP in der chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU
München, Klinikum Groshadern, Direktor: Prof. Dr. med. F. W.
Schildberg, vom 1.6.1998 bis 31.12.1999
Assistenzarzt an der herzchirurgischen Klinik, Klinikum
Augsburg, Direktor: Prof. Dr. med. M. Beyer seit 10.1.2000

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer danke ich nicht nur für die Überlassung der Arbeit und für die wissenschaftliche Unterstützung, während des Projektes, sondern insbesondere auch für sein Vertrauen gegenüber der Arbeitsgruppe besonders in schwierigen Situationen.

Meinem Mitdoktoranden Dr. E. Thein gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Zusammenarbeit. Ohne seine tatkräftige Mitarbeit und seinen Ideenreichtum bei der Automatisierung der Methode hätte dieses Projekt nicht erfolgreich beendet werden können.

Herrn Dr. A. G. Harris danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung englischsprachiger Publikationen und deren Präsentation auf Kongressen.

Bei Herrn PD Dr. M. Kleen, Herrn PD Dr. O. Habler, Herrn Dr. F. Meisner und Herrn Dr. A. Pape bedanke ich mich für die Unterstützung der Tierversuche und die immer vorhandene fruchtbare Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. S. Huckins von der Firma Perkin Elmer bedanke ich mich für die Überlassung des Fluoreszenzmeßplatzes und die prompten Unterstützung bei der Erstellung der Software.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung. Bei einem Projekt dieser Größe gibt es über die Jahre hinweg keinen, der nicht durch seine Mithilfe in Tat und Rat zum Gelingen beigetragen hat.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die permanente Unterstützung während meines Studiums.

Insbesondere danke ich meiner Ehefrau Martina Raab, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.