

Weiterentwicklung und Evaluierung der neuen Offenen Mikroperfusion für die Anwendung im Tiermodell

Diplomarbeit
von
Drazen Ivanis

Technische Universität Graz
Institut für Health Care Engineering



Begutachter:
Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.techn Jörg Schröttner

In Zusammenarbeit mit Joanneum Research Forschungsgesellschaft m.b.H.
Institut für Medizinische Systemtechnik und Gesundheitsmanagement



Betreut von
Dipl.-Ing. Christian Höfferer
Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.techn Jörg Schröttner

Graz, im März 2010

Kurzfassung

Durch die offene Mikroperfusion (OFM) wird ein Zugang zum interstitiellen Flüssigkeitsraum des Gewebes durch einen Katheter mit makroskopischen Öffnungen geschaffen. Basierend auf bereits entwickelten und manuell assemblierten linearen OFM Kathetern wird ein neuer teilweise maschinell gefertigter Katheter (Braid) für eine Vergleichsstudie in Tieren angepasst und sowohl dem OFM Vorgängermodellen als auch den kommerziell erhältlichen Mikrodialyse (MD) Kathetern in der Haut und im subkutanen Fettgewebe gegenübergestellt. Die Wiederfindungsrate (Recovery) der klein- (Natrium), mittel- (Inulin) und großmolekularen Substanz (Albumin) wurde als Kriterium für die Bewertung der Katheterperformance herangezogen. Die Setzbarkeit und das Handling des Katheters wurden das erste Mal in *in vivo* Rattenversuchen untersucht. Für die Implantation des Katheters wurde eine abrissfeste Verbindung mit der Implantationsnadel realisiert. In sechs Schweineversuchen wurde ein optimales Samplingsystem für eine kontinuierliche Probengewinnung entwickelt. Die erhaltenen Ergebnisse aus zwei weiteren Schweineversuchen zeigen, dass der neue Braid Katheter für die dermale Anwendung im Tiermodell gut geeignet ist. Beim subkutanen Sampling konnte die großmolekulare Substanz Albumin nur durch den Braid Katheter nachgewiesen werden. Der neue Braid Katheter bietet den Vorteil einer reproduzierbaren Austauschfläche und somit eine präzise Probenextraktion. Gute Handhabbarkeit, hohe Flexibilität und hohe Recovery, einschließlich großmolekularen Substanzen, bilden die Basis für zukünftige Humanversuche.

Schlüsselwörter: Offene Mikroperfusion, Mikrodialyse, Braid Katheter, Wiederfindungsrate, Recovery.

Abstract

By open flow microperfusion (OFM), the access to the interstitial fluid space of the tissue is created with catheters with macroscopic holes. Based on previously developed and manually assembled linear OFM catheter, the new partially machine-made catheter (Braid) has been adapted for a comparative study in animals and compared with previous OFM models as well as commercially available microdialysis (MD) catheters, in both dermal and subcutaneous tissue. The recovery rate of the small (sodium), medium (inulin) and large molecular substances (albumin) was used as a criterion for the evaluation of catheter performance. The implantation and the handling of the catheter was for the first time explored in *in vivo* rat experiments. For the implantation of the catheter one tensile splice with the implantation-needle was assembled. By six pig experiments an optimal sampling system for continuous sample collection was developed. The results obtained from further two pig experiments show that the new Braid catheter is very well suitable for dermal application in pig. By subcutaneous sampling, the large-molecular substance albumin could only be detected by the Braid catheter. The new Braid catheter offers the advantage of a reproducible exchange area and therefore an accurate sample extraction. Good handling, high flexibility and high recovery rate including large molecular substances are the basis for future human experiments.

Keywords: open flow microperfusion, microdialysis, braid catheter, recovery rate

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008
Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....
(Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors des Institutes für Medizinische Systemtechnik und Gesundheitsmanagement der JOANNEUM RESEARCH GmbH. Mein spezieller Dank gilt MTA Maria Ratzler und MTA Agnes Prasch für die Durchführung der Analytik der gesammelten Proben. Einen großen Dank möchte ich meinem Betreuer DI Christian Höfferer ausdrücken, für die kontinuierliche Unterstützung und Betreuung bei dieser Arbeit. Ich danke auch den Institutsleitern Dr Frank Sinner und DI Manfred Bodenlenz und der Gruppe des Institutes für Medizinische Systemtechnik und Gesundheitsmanagement für die konsequente und kompetente Unterstützung und für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Weiters bedanke ich mich bei Dr. Eva Svehlikova, den Mitarbeitern des Institutes für Biomedizinische Forschung (Hahnhof) und der Sektion für Chirurgische Forschung der Universitätsklinik für Chirurgie der Medizinischen Universität Graz für die Unterstützung bei den Tierversuchen. Bei Univ.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. techn. Jörg Schröttner für die Begutachtung meiner Diplomarbeit und die Unterstützung während der Studienzeit. Auch möchte ich den Mitarbeitern des Institutes für eine tolle Mitarbeit während meiner Tätigkeit als Studienassistent am Institut für Health Care Engineering danken. Meinen Studienkollegen, Bojana Stojcic, Miroslav Kopsa und Kuloglija Nermin für die langjährige Unterstützung während der Studientage. Zu guter letzt bei meinen Eltern und Großeltern ohne deren persönliche Hilfe und finanzielle Mittel ich dieses Studium nicht hätte vollenden können.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODEN	5
2.1.	Mikrodialyse	5
2.2.	Offene Mikroperfusion	6
2.3.	Die Katheter	7
2.3.1.	MD: "CMA 60 Microdialysis Catheter"	7
2.3.2.	MD: "CMA 66 Linear Microdialysis Catheter"	8
2.3.3.	OFM 'alt': "Helix Katheter"	8
2.3.4.	OFM 'neu': "Braid Katheter"	9
2.3.5.	OFM 'alt': "18-G-Katheter"	9
2.4.	Assemblierung des „Braid Katheter“	11
2.4.1.	Crimpen und Kleben des Katheters mit einer Kanüle	11
2.4.2.	Kleben des Katheters mit einer speziell gefertigten Nadel	12
2.5.	Zugversuche	14
2.5.1.	Hintergrund	14
2.5.2.	Durchführung	14
2.6.	Methoden zur Quantifizierung molekularer Substanzen aus dem interstitiellen Raum – Grundlagen der Referenztechniken	16
2.6.1.	Ionenreferenzmethode	18
2.6.2.	Inulin und Albumin als externe Referenzsubstanzen	18
2.7.	In vitro Flussratenbestimmung	19
2.8.	In vivo Rattenversuche	21
2.8.1.	Art der Versuchstiere	21
2.8.2.	Vorbereitung und Narkose der Versuchstiere	22
2.8.3.	Versuchsdurchführung	23
2.8.4.	Materialien und Hilfsmittel	26
2.9.	In vivo Schweineversuche	27
2.9.1.	Art der Versuchstiere	27
2.9.2.	Vorbereitung und Narkose der Versuchstiere	28
2.9.3.	Versuchsdurchführung	30
2.9.4.	Materialien und Hilfsmittel	36
2.10.	Auswertung und Analytik	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	Assemblierung des „Braid Katheter“	38
3.2.	Zugversuche	38
3.3.	In vitro Flussratenbestimmung	39

3.4.	In vivo Flussratenbestimmung - Rattenversuche	40
3.5.	Setzversuche - In Vivo Schweineversuche (S1-S6)	41
3.5.1.	Der erste Versuch (S01)	41
3.5.2.	Der zweite Versuch (S02)	42
3.5.3.	Der dritte Versuch (S03)	43
3.5.4.	Der vierte Versuch (S04).....	44
3.5.5.	Der fünfte Versuch (S05)	47
3.5.6.	Der sechste Versuch (S06)	48
3.6.	In vivo Schweineversuche - Nachweis der klein-, mittel-, und großmolekularen Substanzen mittels Wiederfindungsrate (Recovery)	49
3.6.1.	Vergleich der Katheter: Dermales Sampling	49
3.6.2.	Vergleich der Katheter: Subkutaner Sampling	52
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	56
4.1.	Assemblierung des „Braid Katheter“	56
4.2.	Zugversuche	56
4.3.	In vitro Flussratenbestimmung	57
4.4.	In vivo Flussratenbestimmung - Rattenversuche	57
4.5.	Setzversuche - In vivo Schweineversuche	57
4.5.1.	Der erste Versuch (S01)	57
4.5.2.	Der zweite Versuch (S02)	58
4.5.3.	Der dritte Versuch (S03)	58
4.5.4.	Der vierte Versuch (S04).....	59
4.5.5.	Der fünfte Versuch (S05)	59
4.5.6.	Der sechste Versuch (S06)	60
4.6.	In vivo Schweineversuche - Nachweis der klein-, mittel-, und großmolekularen Substanzen mittels Wiederfindungsrate (Recovery)	60
4.6.1.	Vergleich der Katheter: Dermales Sampling	60
4.6.2.	Vergleich der Katheter: Subkutaner Sampling	61
5.	SCHLUSSFOLGERUNG	62
6.	LITERATURVERZEICHNIS	63
7.	APPENDIX	65
	Flussraten und Katheteranordnung der Versuche S1 bis S6	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Hautschichten	1
Abb. 2: linearer OFM Katheter – schematische Darstellung	3
Abb. 3: Das Prinzip der Mikrodialyse [www.microdialysis.se; 15.01.2010]	5
Abb. 4: Schematische Darstellung eines konzentrischem MD Katheters im ISF	5
Abb. 5: Semi-Permeable Membran der Mikrodialyse	6
Abb. 6: Makroskopische Öffnungen der 18G OFM Katheter	6
Abb. 7: Konzept des OFM Systems	7
Abb. 8: Der CMA 60 Katheter [www.microdialysis.se; 30.10.2008]	7
Abb. 9: CMA 66 Katheter [www.microdialysis.se; 30.10.2008]	8
Abb. 10: CMA 66 Katheter Implantiert [www.microdialysis.se; 30.10.2008]	8
Abb. 11: Der Helix Katheter	8
Abb. 12: Der Braid Katheter	9
Abb. 13: Außenteil des 18G Katheters	10
Abb. 14: Außen und Innenteil des 18G Katheters	10
Abb. 15: Verkürzen des Katheters mit einem Seitenschneider	11
Abb. 16: Vergleich original und verkürzt	11
Abb. 17: Einschieben des Stützdrahtes in die Kanüle	12
Abb. 18: Crimpen der Kanüle	12
Abb. 19: Unimed Nadel	12
Abb. 20: Einführen der Nadel in den Katheter	13
Abb. 21: Kleben der Nadel mit dem Katheter	13
Abb. 22: Durchgeschnittener Katheter	14
Abb. 23: Eingespanntes Teilstück Katheter-Nadel in die zwei dafür vorgesehenen Klemmzwingen	15
Abb. 24: Edelstahlröhrchen in den Schläuchen	19
Abb. 25: Sammeln der Proben (Sampling)	19
Abb. 26: Typischer in vitro Versuchsaufbau	20
Abb. 27: Schematische Anordnung und Anzahl der sechs Katheter	23
Abb. 28: Intradermale Implantation mittels einer steifen Setznadel und Nadelhalter	24
Abb. 29: Implantierte Setznadel	24
Abb. 30: Zeitlicher Ablauf des Versuches	24
Abb. 31: Versuchsaufbau: Geräte und Versuchsetup	25
Abb. 32: Versuchsaufbau: Narkotisierte Ratte und Versuchsetup	25
Abb. 33: Schematische Darstellung der Anordnung der verwendeten Katheter	30
Abb. 34: Implantation des Braid Katheters: Einführen der Nadel	31
Abb. 35: Durchziehen des Katheters	31
Abb. 36: Kleben der implantierten Braid Kathetern	31
Abb. 37: Die dermalen Braid Katheter	31
Abb. 38: Durchstechen der subkutanen Fettgewebe	32
Abb. 39: Durchziehen des Katheters durch die Kanüle	32
Abb. 40: Die subkutanen Braid Katheter	32
Abb. 41: Einführen der Nadel in die Haut	32
Abb. 42: Die dermalen Helix Katheter	32
Abb. 43: Einführen der Kanüle in die Haut	32
Abb. 44: Durchziehen des Katheters durch die Kanüle	32
Abb. 45: Die dermalen CMA 66 Katheter	32
Abb. 46: Einführen der Introducer Kanüle in das Fettgewebe	33
Abb. 47: Entfernen der Introducer Kanüle	33
Abb. 48: Die fixierten subkutanen CMA 60 Katheter	33

Abb. 49: Einführen des 18G Katheters in die Fettgewebe.....	33
Abb. 50: Die subkutanen 18G Katheter	33
Abb. 51: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.....	34
Abb. 52: Typischer Versuchsaufbau	35
Abb. 53: Katheter geklebt an die Unimed Nadel	38
Abb. 54: Katheter geklebt an die gecrimpte Kanüle und Stützdraht.....	38
Abb. 55: Abrisskräfte der 50 getesteten Katheter	38
Abb. 56: Zeitlicher Verlauf der Flussrate für ID 0,25mm Schläuche	39
Abb. 57: Mittelwert und Standardabweichung der beiden Kathetergruppen.....	40
Abb. 58: Setzen mit einer Kanüle Ø0,5mm. Distanz zwischen zwei Punkten ca. 15mm.....	41
Abb. 59: Verbiegen der Kanüle durch das Setzen	41
Abb. 60: Entstehung der Koagulationen am Katheterausgang	42
Abb. 61: Blutkoagulation im Übergang Katheterausfluss - Saugschlauch	42
Abb. 62: Blutanlagerung am Saugschlauch	43
Abb. 63: Blutkoagulation im Katheterausfluss -Saugschlauch und Luftblasen im Schlauch..	43
Abb. 64: Setzen mit Nadel Ø 0,5mm	44
Abb. 65: Setzen mit Kanüle Ø 0,8mm	44
Abb. 66: Flussraten der Ofm1-Ofm3 Katheter beim S04 Versuch	44
Abb. 67: Flussraten der Ofm4-Ofm6 Katheter beim S04 Versuch	45
Abb. 68: Flussraten der Ofm7-Ofm9 Katheter beim S04 Versuch	45
Abb. 69: Flussraten der Ofm10-Ofm12 Katheter beim S04 Versuch	46
Abb. 70: Flussraten der Ofm13-Ofm15 Katheter beim S04 Versuch	46
Abb. 71: Flussraten der Md1-Md3 Katheter beim S04 Versuch.....	47
Abb. 72: Vergleich der Natriumkonzentrationen (S7, S8) der Braid, Helix und CMA 66 Katheter - dermale Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze.....	50
Abb. 73: Vergleich der Na Wiederfindungsraten (Recoveries) (S7, S8) der Braid, Helix und CMA 66 Katheter - dermale Katheter	50
Abb. 74: Vergleich der Inulinkonzentrationen (S7, S8) der Braid, Helix und CMA66 Katheter - dermale Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze.....	51
Abb. 75: Vergleich der Inulin Recoveries (S7, S8) der Braid, Helix und CMA66 Katheter - dermale Katheter	51
Abb. 76: Vergleich der Na-Konzentrationen (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze.....	52
Abb. 77: Vergleich der Na Recoveries (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter - subkutane Katheter.....	53
Abb. 78: Vergleich der Inulinkonzentrationen (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze.....	54
Abb. 79: Vergleich der Inulin Recoveries (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter.....	54
Abb. 80: Vergleich der Albuminkonzentrationen (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze.....	55
Abb. 81: Vergleich der Albumin Recoveries (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter.....	55
Abb. 82: Trendlinie der Reißkräfte	56
Abb. 83: Abstand der Nadel zur Hautoberfläche beim Setzen hervorgerufen durch die Stärke/Größe des Nadelhalters	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Analytikmethoden zur Auswertung der Moleküle verschiedener Molekulargewichten.....	37
Tabelle 2: Untere und obere Quantifizierungsgrenze der ausgewählten Analyten.....	37
Tabelle 3: Präzision der Analytikmethode mit verwendetem Messgerät.....	37
Tabelle 4: Prüfprotokoll für S07 und S08 Versuch.....	49
Tabelle 5: Maximale Recovery Wert der dermalen OFM und MD Katheter <LLoQ: Unter der Nachweisgrenze	60
Tabelle 6: Maximale Recovery Wert der subkutanen OFM und MD Katheter <LLoQ: Unter der Nachweisgrenze	61
Tabelle 7: Prüfprotokoll für S01 Versuch.....	65
Tabelle 8: Prüfprotokoll für S02 Versuch.....	65
Tabelle 9: Prüfprotokoll für S03 Versuch.....	65
Tabelle 10: Prüfprotokoll für S04 Versuch.....	66
Tabelle 11: Prüfprotokoll für S05 Versuch.....	66
Tabelle 12: Prüfprotokoll für S06 Versuch.....	66

Begriffserklärung

„ad libitum“ – nach Belieben (wird üblicherweise verwendet um die Futtergabe von Versuchstieren zu beschreiben).

„Flowrate“ - Flüssigkeitsvolumen pro Zeiteinheit

„in vivo“ - im lebenden Organismus

„in vitro“ - außerhalb des Organismus

„kutan / dermal“ - die Haut betreffend

„Recovery“ - Verhältnis der Konzentration einer Substanz im Sample zu ihrer Konzentration im interstitiellen Flüssigkeitsraum (wird auch als ‚relative recovery‘ bezeichnet). Diese wird in % angegeben.

„Sample“ - Gesammeltes Dialysat bzw. Rückperfusat von Mikroperfusionskathetern. Ausfluss aus den Kathetern, welcher in kleinen Probenbehältern (Vials) gesammelt und im Labor analysiert wird.

„Charge“ - gleich bleibende Gütermenge mit gleichen Eigenschaften, die in einem zusammenhängenden Produktionsprozess hergestellt wird

„subkutan“ - unter der/die Haut, in der/die Subkutis

„topische Applikation“ – nur örtliche (meist oberflächliche) Verabreichung (im Gegensatz zur systemischen Applikation (Blutkreislauf))

„Vial“ - PCR Tubes oder auch Soft Tubes®. Proben- (Sample-) behältnis mit einem Inhalt von 200µl bis 500 µl und Verschlussdeckel.

Abkürzungen

AD; Ø	Außendurchmesser
Da	Dalton
Div.	Divers
ID	Innendurchmesser
i.v	Intravenös
i.p	Intraperitoneal (in die Bauchhöhle)
ISF	Interstitielle Flüssigkeit
JR	Joanneum Research
K	Kalium
KG	Körpergewicht
LLoQ	Lower Limit of Quantification (untere Quantifizierungsgrenze)
MD; µD	Mikrodialyse
Na	Natrium
OFM	open-flow microperfusion (Offene Mikroperfusion)
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon®)
SD	Standardabweichung
ULoQ	Upper Limit of Quantification (obere Quantifizierungsgrenze)
Vgl.	vergleichbar

1. Einleitung

„Die Haut (lat. cutis) ist flächenmäßig das größte (je nach Körperumfang und Körpergröße 1,5 bis 2m²), das schwerste (bis zu 10kg) und funktionell das vielseitigste Organ des menschlichen oder tierischen Organismus. Sie dient der Abgrenzung von Innen und Außen (Hüllorgan), dem Schutz vor Umwelteinflüssen, Kommunikation und Wahrung der Homöostase (inneres Gleichgewicht). Weiterhin übernimmt die Haut wichtige Funktionen im Bereich des Stoffwechsels und der Immunologie und verfügt über vielfältige Anpassungsmechanismen[19]“. Die Haut ist aus drei Schichten gebildet: der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der Unterhaut (Hypodermis) (vgl. Abb. 1) [8; 9].

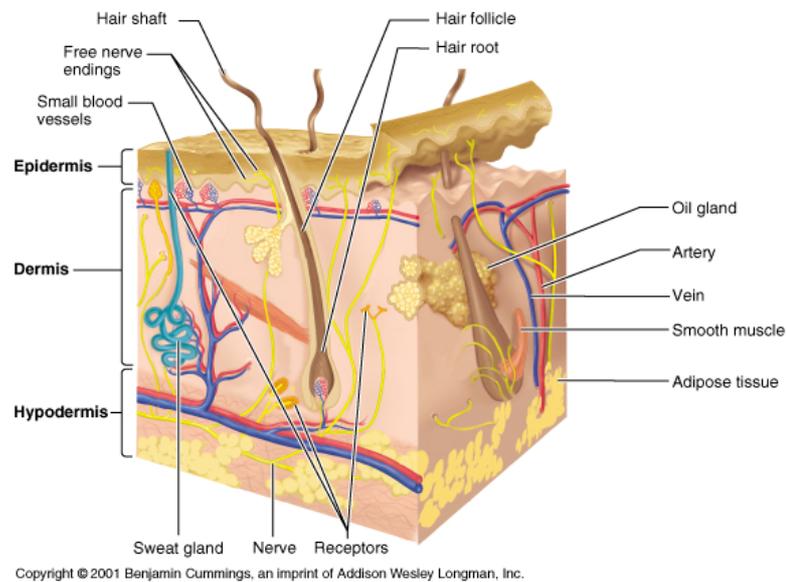


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hautschichten.
[Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc]

Eine intakte Haut ist von großer Wichtigkeit für die menschliche Gesundheit. Erkrankungen der Haut stellen eine ernst zu nehmende Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit dar und müssen therapeutisch behandelt werden. Hauterkrankungen sind weit verbreitet, zeigen eine steigende Prävalenz und schränken zum Teil die Lebensqualität der Betroffenen sehr ein. Zu diesen Erkrankungen gehören z.B. die Psoriasis, die atopische Dermatitis (Neurodermitis) als wichtigste Vertreter der entzündlichen Dermatosen, die verschiedene Formen und Vorstadien von Hautkrebs, die vielfältigen immunologischen Funktionsstörungen als Ausdruck durch Allergien bzw. Autoimmundermatosen sowie die zahlreichen Infektionserkrankungen der Haut [1].

Zur therapeutischen Behandlung der Hautkrankheiten entwickelt die Pharmaindustrie eine Reihe von Wirkstoffen in verschiedensten Formulierungen (z.B. in Form von Cremes, Tabletten, etc.). Mit dermatologischen Präparaten erwirtschaftet die Pharmaindustrie heute bereits 7% des gesamten Umsatzes mit weiter steigender Tendenz. Im Bereich der Forschung und Entwicklung neuer dermatologischer Wirkstoffe bzw. neu formulierter Wirkstoffe müssen folgende Punkte detailliert untersucht und beschrieben werden:

Einleitung

- a) die zeitliche Aufnahme und Konzentration eines Wirkstoffs im Zielorgan (Pharmakokinetik, PK)
- b) sowie seine Wirksamkeit (Pharmakodynamik, PD)

Im Fall einer topischen Behandlung von großer Bedeutung ist die zeitliche Verfolgung der Penetration von Wirkstoffen in und durch gesunde sowie erkrankte Haut. Zusammenfassend, **die Erfassung der Penetration von Wirkstoffen in und durch die Haut sowie ihrer pharmakologischen Effekte ist für die medizinische Forschung und pharmazeutische Entwicklung ein Gebiet von großer Wichtigkeit.**

Zur Untersuchung der PK und PD in der Haut stehen verschiedenste Techniken zur Verfügung, jedoch kann zusammenfassend festgehalten werden, dass alle derzeitigen *in vivo state of the art* Methoden für den Zweck der Wirkstoffuntersuchung in der Haut gravierende Einschränkungen aufweisen. Invasive Methoden, wie z.B. Biopsien dürfen erst in besonders begründeten Fällen durchgeführt werden und ergeben einmalige Messwerte (Spotmessung).

Die Methode der Mikrodialyse [2] ist die am weitesten verbreitete Methode, um Substanzen, Medikamente oder andere Moleküle im interstitiellen Raum von Körpergewebe zu untersuchen. Das Konzept der Mikrodialyse (MD) wurde in frühen 1970-er Jahren geboren. Während der Untersuchung eines Blutgefäßes zwischen fluoreszenten Nervenendungen kam Professor Urban Ungerstedt von der Karolinska Institute in Stockholm auf die Idee, das Dialyseröhrchen als eine künstliche Blutkapillare anzuwenden, um chemische Vorgänge im Gewebe zu überwachen. Die erste wissenschaftliche Arbeit über Mikrodialyse wurde im Jahr 1974 veröffentlicht. Seitdem gibt es über 12.000 wissenschaftliche Veröffentlichungen über die Technik der Mikrodialyse, ca. 2.000 davon sind klinische Untersuchungen.

Jedoch exkludiert die angewandte semi-permeable Membran bei der Mikrodialyse viele körpereigene Substanzen von der Messung (mittel- bis großmolekulare, proteingebundene und vor allem lipophile Moleküle) [3; 4]. Daher bewirkt die etablierte minimalinvasive Methode der Mikrodialyse auch starke Limitierungen für lipophile und großmolekulare Substanzen. Im ‚White Paper‘ der American Food and Drug Administration (FDA) [5] werden die Limitierungen der bestehenden Methoden, sowie Anforderungen zusammengefasst. Darin wird ein besonderes Augenmerk auf die Validität der Methode für die spezifische pharmakologische Anwendung gelegt.

Die „Offene Mikroperfusion“ (OFM) [6; 7] ist eine Samplingtechnik deren Funktionsweise der Mikrodialyse sehr ähnlich ist, verwendet jedoch keine semipermeable Membran. Durch das Wegfallen der Membran bei der OFM Technik, bleiben die limitierenden Membraneffekte aus, was einen direkten Zugang zum interstitiellen Raum erlaubt (Abb. 2). Da die interstitielle Flüssigkeit (ISF) mit dem Perfusat im direkten Kontakt ist, können die großen Moleküle ungehindert gesammelt werden. Die herkömmlichen OFM Katheter wurden als Doppellumen-Katheter entwickelt, dessen Austauschfläche durch die Perforation der Katheteroberfläche gebildet wird. Die Doppellumen-Katheter (Type No. 18G und 24G) werden für das Sampling der Moleküle im Muskel und Fettgewebe eingesetzt und waren für den Einsatz in der Dermis der Haut anhand ihrer Größe ungeeignet. Das Institut für Medizinische Systemtechnik der Joanneum Research Forschungsgesellschaft m.b.H. entwickelte einen OFM Katheter für die intradermale Anwendung [8] und eröffnete somit ein neues Einsatzgebiet der OFM Technik. Der erste lineare Dermalkatheter, der „Helix Katheter“, hat eine helixförmige Austauschfläche, die sich mehrfach windet und Austausch in alle Richtungen ermöglicht (Abb. 11). Der Katheter wurde aus dem Material PTFE (Teflon) gefertigt, mit einem Außendurchmesser (AD) von 0.4mm und einem Innendurchmesser (ID) von 0.25mm.

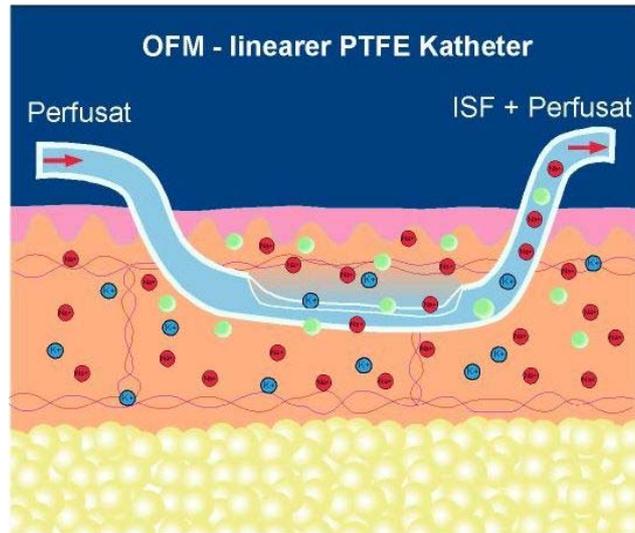


Abb. 2: linearer OFM Katheter – schematische Darstellung

Die intradermale Implantation eines derart dimensionierten Katheter mit einer Setznadel vergleichbaren Durchmessers war erfolgreich. Wegen guter Setzbarkeit und guter Verträglichkeit des Materials mit dem Gewebe, wurde der Helix Katheter nicht nur bei den in vivo Tierversuchen angewendet, sondern auch in klinischen Studien mit Menschen [8; 9].

Jedoch wird der ganze Helix Katheter aus dem Teflon Schlauch händisch gefertigt, was die Reproduzierbarkeit der Austauschfläche erschwert und für die Standardisierung des Herstellungsprozesses enorme Anforderungen darstellt. Ein weiterer Nachteil des Helix Katheters ist, dass bei den Humanversuchen bei der Implantation des Katheters zwischendurch zur Ausdehnung seiner helikalen Austauschfläche gekommen ist, was die Samplingeffizienz beeinflusst hat. Alle diese Hindernisse haben am Institut für Medizinische Systemtechnik und Gesundheitsmanagement dazu geführt, einen neuen Katheter zu entwickeln. Eine der Voraussetzungen für den neuen dermalen Katheter war die maschinelle Fertigung zum Zwecke einer besseren Standardisierung des Herstellungsprozesses.

Der neue „Braid Katheter“ ist ein linearer, minimal invasiver Katheter, dessen Schlauch inklusive Austauschfläche maschinell hergestellt wird und soll zukünftig in den klinischen Studien am Menschen eingesetzt werden. Als Vorbereitung für die humane Anwendung ist der Braid Katheter für die Implantation in einem Tiermodell zu assemblieren und die Performance des Katheters durch eine Tierversuchsreihe zu testen. Der Katheter soll in Verbindung mit einer dünnen Nadel gebracht werden, sodass das Setztrauma minimal ist. Die Belastbarkeit der Verbindung mit der Nadel soll durch Zugversuche untersucht werden.

Nach der erfolgreichen Assemblierung des Braid Katheters, sollten die OFM Katheter (18 G, Helix, Braid) mit den Modellen der Mikrodialyse (MD) (CMA 60, CMA 66) in einer Versuchsreihe verglichen werden. Die Versuche werden durchgeführt, um die Performance der MD und OFM Katheter zu vergleichen und für Anwendungen im Bereich der klinischen Forschung zu testen und zu evaluieren. Die im ‚White Paper‘ beschriebenen Anforderungen an eine kontinuierliche Probengewinnung in der Haut zur Aufnahme von PK und PD sind, basierend auf den bisherigen Ergebnissen diverser Projekte, durch die Offene Mikroperfusion (OFM) zu erfüllen. Erfolgreich reproduzierte Ergebnisse in der Vergangenheit bei der quantitativen interstitiellen Bestimmung von Peptidhormonkonzentrationen [10; 11] sowie auch neueste Daten aus der Dermatologie [12] lassen eine erfolgreiche (pharmakologische)

Einleitung

Validierung der Methode für den Anwendungsbereich Dermatologie als sehr wahrscheinlich erscheinen.

Die Aufgaben der vorliegenden Arbeit können daher wie folgt kurz zusammengefasst werden:

- Herstellung einer Verbindung des Katheters mit der Setznadel
- Überprüfung der Reißfestigkeit der Verbindung durch Zugversuche
- Implantation des Braid Katheters im Tier
- Test der Realisierbarkeit und der Effizienz des „Braid-Katheters“ bezüglich:
 - der dermalen und subkutanen Applikation und
 - des Samplings von interstitieller Flüssigkeit (ISF) in vivo im Tier (Ratte und Schwein)
- Weiterentwicklung und Anpassung des Braid Katheters für weitere Tierversuche, und auch für zukünftige klinische Studien am Menschen
- Evaluierung der „neuen“ OFM Technik (Braid) durch Vergleich der Recoveries von klein-, mittel- und großmolekularen Substanzen mit der „alten“ OFM Technik (dermal: Helix; subkutan: 18G) und der Mikrodialyse (MD)

2. Methoden

2.1. Mikrodialyse

Die Mikrodialyse (MD) ist ein biophysikalisches Verfahren zur Untersuchung und Überwachung von chemischen Vorgängen im lebenden Gewebe. Mit dieser minimal invasiven Samplingtechnik werden die Substanzen, welche sich im interstitiellen Flüssigkeitsraum von Geweben befinden, durch eine hohle semipermeable Membran (Abb. 5) gesammelt. Dieser MD Katheter ist dabei so ausgeführt, dass er eine Blutkapillare imitiert. Daher wird eine kontinuierliche Überwachung durch Implantation eines MD Katheters in das zu untersuchende Gewebe ermöglicht. Wird eine physiologische Perfusionslösung (Perfusat) mit einer langsamen und konstanten Flussgeschwindigkeit (Flowrate) durch den MD Katheter gepumpt, so kommt es zur Vermischung zwischen Perfusat und interstitieller Flüssigkeit (ISF) (Abb. 3). Die Flussrate liegt typisch zwischen 0,1 und 5 Mikroliter pro Minute ($\mu\text{l}/\text{min}$) [5]. In den konzentrischen Katheter fließt das Perfusat durch das Innenrohr und füllt den Raum zwischen dem Innenrohr und Membran (Abb. 4). Die semipermeable Membran lässt die Substanzen einer gewissen Größe durch, mit dem ISF als Träger, wodurch ein diffusionsgerichteter Transport zu Stande kommt, bzw. die Diffusion der Moleküle zwischen ISF und Perfusat. Das Endprodukt des diffusionsgerichteten Transportes bei der Mikrodialyse ist das Dialysat.

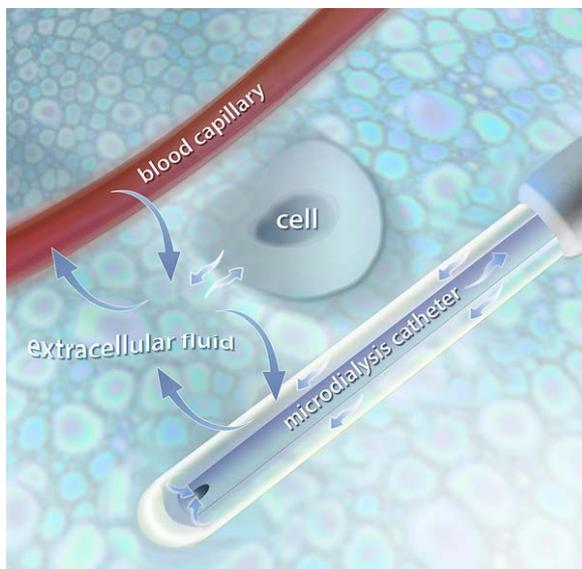


Abb. 3: Das Prinzip der Mikrodialyse
[www.microdialysis.se; 15.01.2010]

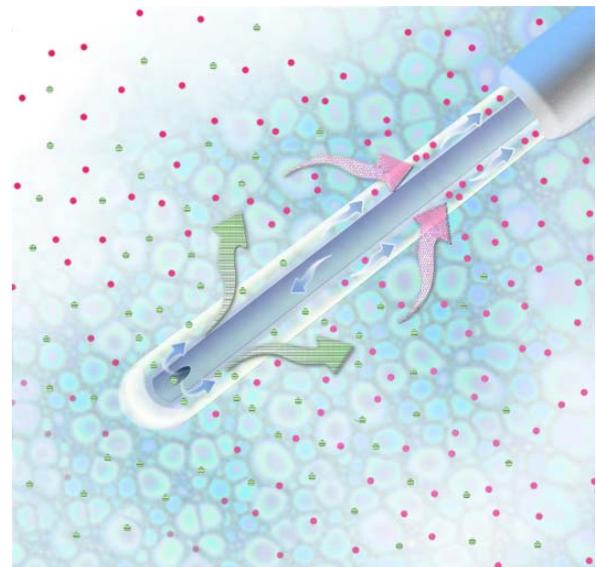


Abb. 4: Schematische Darstellung eines konzentrischen MD Katheters im ISF
[www.microdialysis.se; 15.01.2010]

Mit diversen Konstruktionen der MD Membranen ist es möglich, Moleküle von 100 bis zu 30kDa nachzuweisen. Zu Beginn wurde die Mikrodialyse zu den Untersuchungen von Gehirn-, Neurophysiologie und Abgabe von Neurotransmitter, Monoamine und Metaboliten, Aminosäuren und anderen kleinen endogenen Verbindungen angewandt.

Der Einsatz der Mikrodialyse hat sich verbreitet im Sampling der Moleküle sowohl im Gewebe wie Muskel, Leber, Fett, als auch im Rückenmark, Gelenkflüssigkeit, Glaskörper des Auges und Blut, zum Abschätzen der Abgabe und Verteilung der Medikamente und Metaboliten und deren Einwirkung auf die endogenen Verbindungen.

2.2. Offene Mikroperfusion

Die „Offene Mikroperfusion“ (OFM) ist eine Samplingtechnik deren Funktionsweise der Mikrodialyse sehr ähnlich ist, verwendet jedoch keine Membran. Die OFM Katheter erlauben durch die makroskopischen Öffnungen (Abb. 6) das Sammeln von klein-, mittel- und großmolekularen Substanzen in verschiedenen menschlichen und tierischen Geweben, z.B. im subkutanen Fettgewebe, in der Dermis der Haut oder im Muskelgewebe. Dadurch können Konzentrationen bestimmter Analyten oder generell physiologische Prozesse in unterschiedlichen Geweben untersucht und überwacht werden. Ebenso können pharmakokinetische Vorgänge direkt am Wirkort untersucht werden.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Kathetern zum Sammeln von Gewebeflüssigkeiten (Mikrodialysekathetern) erlaubt der OFM Katheter auch das Sammeln von großmolekularen Substanzen, die bei der Mikrodialysetechnik aufgrund des Porendurchmessers (Abb. 5 und Abb. 6) der verwendeten Membran nicht in das Katheterinnere dringen können. Ein weiterer Vorteil der OFM Technik ist, dass lipophile Substanzen nicht auf einer Membran kleben bleiben können, welche bei der Mikrodialysetechnik verwendet wird.

Mit der Mikroperfusionstechnik werden:

- eine große Bandbreite an Analyten aus dem Untersuchungsgewebe gesammelt.
- Analyten aus dem Zielgewebe extrahiert, ohne dass eine Blutentnahme notwendig ist.
- kontinuierlich Proben gesammelt
- Standardkomponenten verwendet

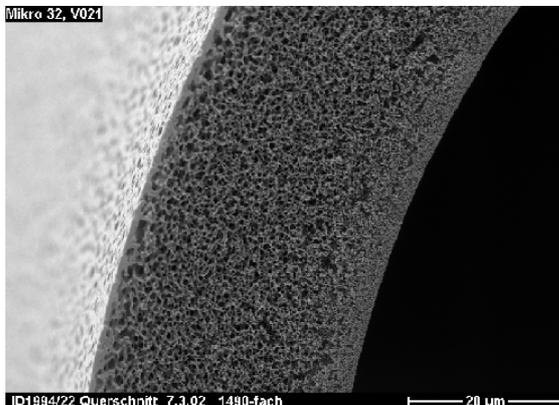


Abb. 5: Semi-Permeable Membran der Mikrodialyse

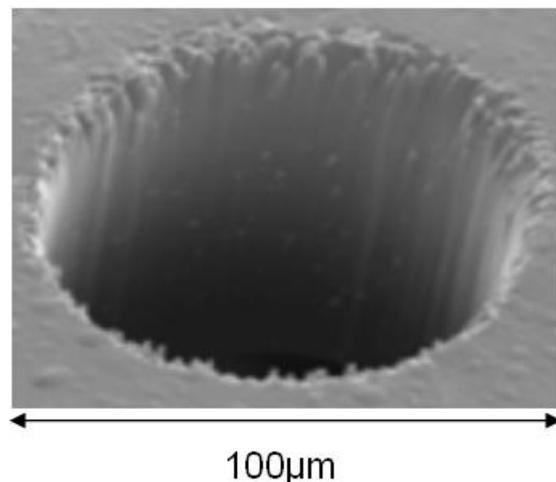


Abb. 6: Makroskopische Öffnungen der 18G OFM Katheter

Die Funktionsweise der OFM Technik wird in Abb. 7 dargestellt:

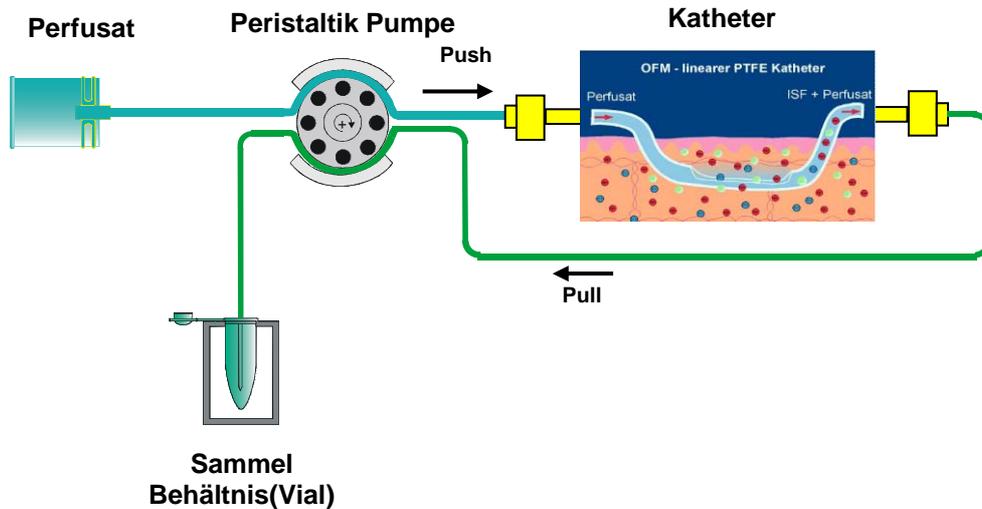


Abb. 7: Konzept des OFM Systems

Der OFM Katheter wird über eine Setznadel in das Zielgewebe (intramuskulär, subkutan, intradermal) implantiert und mit einem Schlauchsystem (Push, Pull) mit der Peristaltikpumpe verbunden. Die Pumpe perfundiert den Katheter konstant über den Push- Zweig mit einer Infusionslösung (Perfusat) und saugt das Rückperfusat über den Pullzweig in ein Sammel-Behältnis (Vial), dessen Inhalt als Probe gespeichert wird. Durch die Perfusion der Austauschfläche des Katheters kommt es zur Anreicherung zwischen Perfusat und ISF des untersuchten Gewebes. So wird das Rückperfusat gewonnen (Perfusat + ISF) und in einem Vial fraktioniert gesammelt und mit hochsensitiver Laboranalytik analysiert.

2.3. Die Katheter

2.3.1. MD: "CMA 60 Microdialysis Catheter"

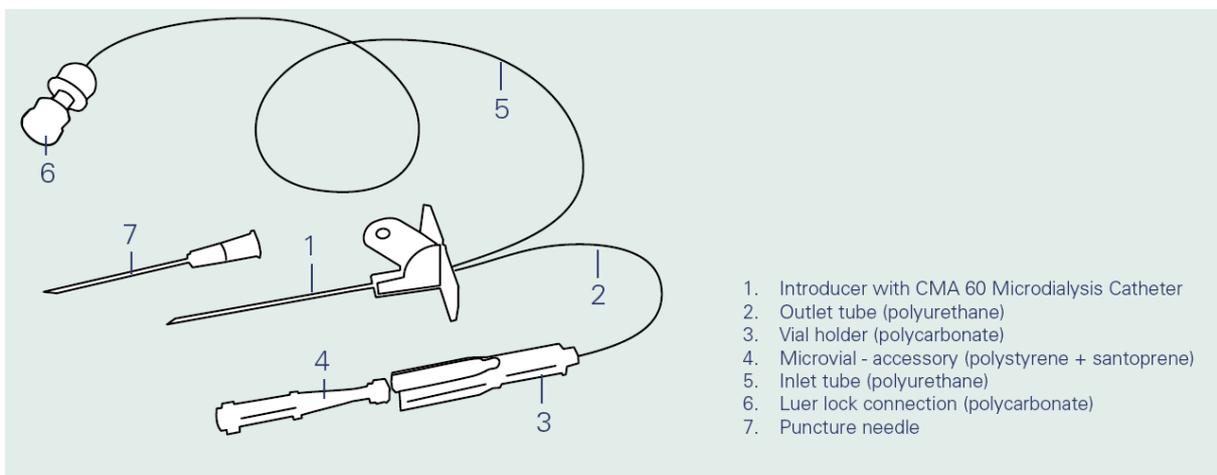


Abb. 8: Der CMA 60 Katheter [www.microdialysis.se; 30.10.2008]

Die Mikro dialyse ist Stand der Technik und damit eine etablierte Methode für die OFM. Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Technik insofern von der OFM verschieden, als die

Austauschfläche von einer Dialysemembran gebildet wird, anstatt wie bei der OFM vollständig offene Bereiche von Stützmaterial begrenzt werden. Der CMA 60 Katheter [CMA Microdialysis AB, Solna Schweden] (Abb. 8) ist ein konzentrischer Katheter und findet die Anwendung bei der Implantation im Fettgewebe und im ruhenden Skelettmuskel. Die Implantation des Katheters geschieht über eine Kanüle (Introducer 1), in die der Katheter eingeschoben wird. Die Kanüle wird in das Gewebe eingeführt und danach entfernt. Deshalb ist die Gewebeverletzung größer, da der Durchmesser der Kanüle größer (1,4mm) ist als der Katheter (0,6mm).

2.3.2. MD: "CMA 66 Linear Microdialysis Catheter"



Abb. 9: CMA 66 Katheter
[www.microdialysis.se; 30.10.2008]

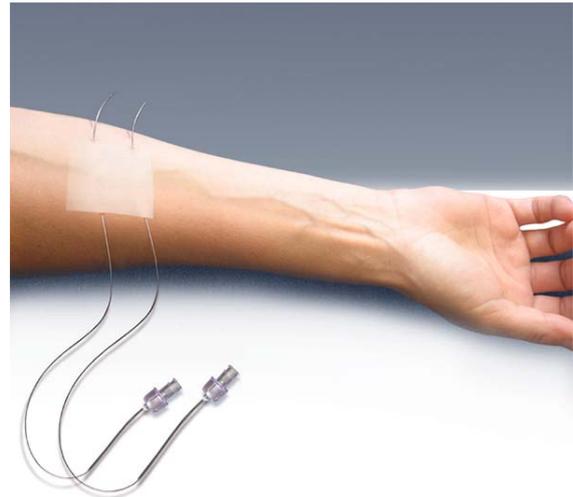


Abb. 10: CMA 66 Katheter Implantiert
[www.microdialysis.se; 30.10.2008]

Der CMA 66 (Abb. 9; Abb. 10) Katheter [CMA Microdialysis AB, Solna Sweden] ist im Gegensatz zum CMA 60 Katheter ein linearer Katheter und kann dank seiner Größe neben der Implantation im subkutanen Fettgewebe und in der ruhenden Skelettmuskulatur auch in die Haut implantiert werden. Gesetzt wird dieser Katheter mit Hilfe einer 21 Gauge (\varnothing 0,8 mm) Setzkanüle.

2.3.3. OFM 'alt': "Helix Katheter"

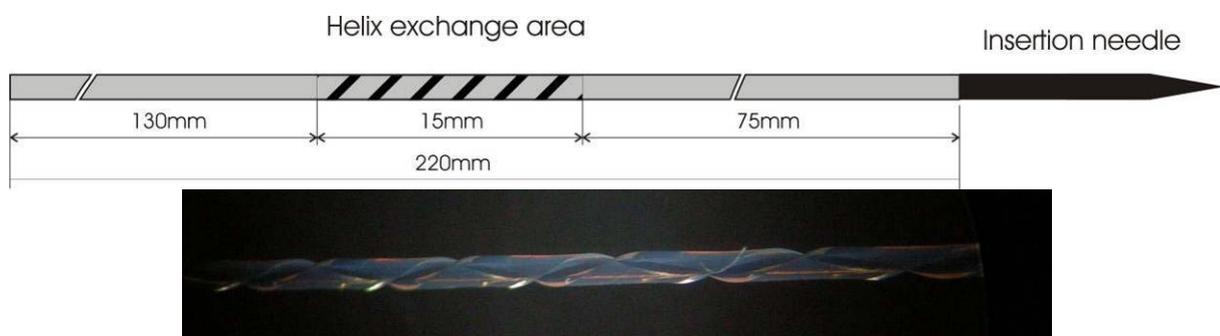


Abb. 11: Der Helix Katheter

Der Helix Katheter (Abb. 11) (\varnothing 0,4mm), bestehend aus einem PTFE-Schlauch (Grundmaterial), hat seinen Namen wegen seiner helikalen Öffnung vom Stützmaterial, die

als Austauschfläche dient. Der Katheter wird mittels Implantationskanüle vergleichbaren Durchmessers in die Haut eingebracht.

2.3.4. OFM 'neu': "Braid Katheter"

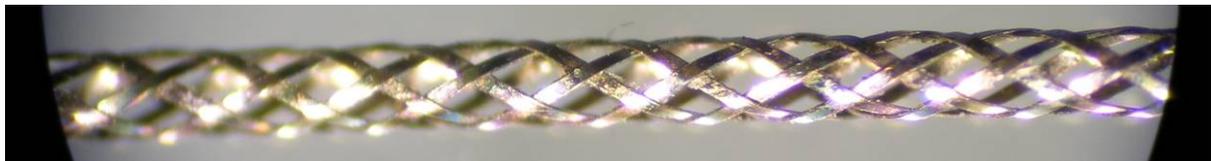
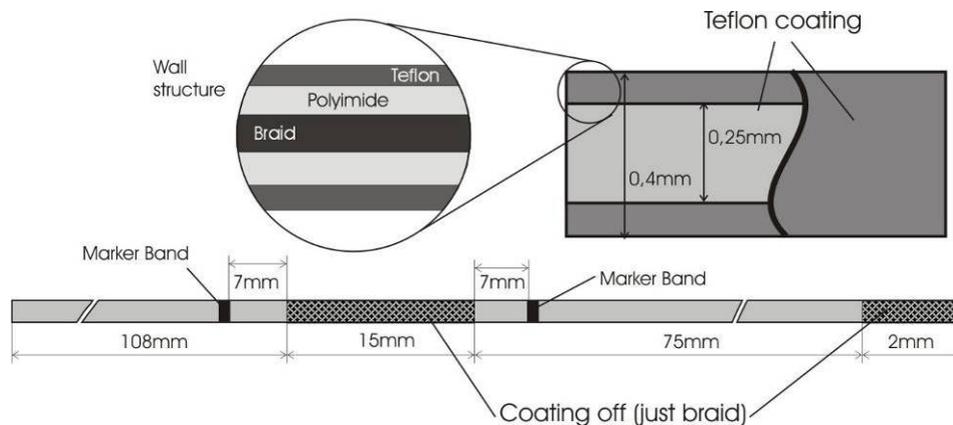


Abb. 12: Der Braid Katheter

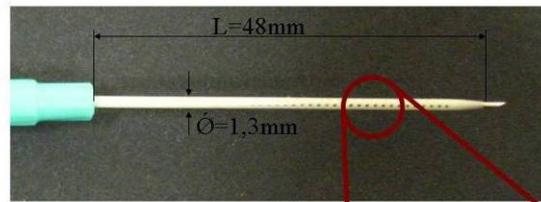
Der Braid Katheter (Abb. 12) (\varnothing 0,4mm) basiert auf einem Mehrschicht-Schlauch. Das innenliegende Drahtgeflecht, auch „Braid“ genannt, dient als Austauschfläche und sorgt für mechanische Stabilität. Die Außen- und Innenseite des Katheters sind mit Teflon beschichtet, was chemische Inertheit und leichtes Gleiten bei der Implantation sicherstellt. In der oberen schematischen Zeichnung dient der 15mm lange freigelaserte Abschnitt als Austauschfläche und der 2mm lange Abschnitt als Klebefläche. Darunter ist die makroskopische Aufnahme der Austauschfläche des Katheters zu sehen.

2.3.5. OFM 'alt': "18-G-Katheter"

Der 18 G OFM Katheter besteht aus zwei Teilen: einem Außenteil und einem Innenteil.

- für das „Außenteil“ (Abb. 13) wird ein handelsüblicher Venenverweilkatheter benutzt, in welchen makroskopische Löchern gelasert werden (4 Reihen zu je 25 Löcher mit dem Durchmesser von ca. 0,5mm). Dieser Katheter wird mithilfe einer Setznadel (gleich wie bei einer Venenverweilkanüle) in das Untersuchungsgewebe gesetzt.
- Das „Innenteil“ (Abb. 14) besteht aus 2 PTFE Schläuchen unterschiedlicher Länge, die als Ein- und Auslass für das Perfundieren des Gewebes und das Sammeln von Gewebeflüssigkeit dienen. Das Innenteil wird mit einem Luer Lok an das Außenteil geschraubt.

18G bd Angiocath Katheter (grün):



- 4 Reihen mit je 25 Löchern und um je 90° radial zueinander verdreht

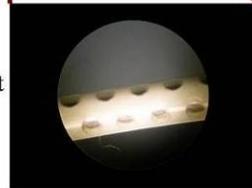


Abb. 13: Außenteil des 18G Katheters



Abb. 14: Außen und Innenteil des 18G Katheters

2.4. Assemblierung des „Braid Katheter“

Um den Braid Katheter bei Tierversuchen bzw. im Bereich der subkutanen und dermalen Anwendung einsetzen zu können muss der Katheter mit einer Setznadel verbunden werden. Es wurden zwei Verbindungsarten untersucht:

2.4.1 Crimpen und Kleben des Katheters mit einer Kanüle

2.4.2 Kleben des Katheters mit einer speziell gefertigten Nadel

Bei 2.4.1 und 2.4.2 wird in den Katheter ein 15mm langer Stützdraht AD 0,215mm eingeschoben. Der Stützdraht dient der Stabilität der Austauschfläche des Katheters während der Implantation. Bei beiden Assemblierungsarten wird mit einem Seitenschneider 3mm von der Gitterstelle der originale Katheter mit dem Stützdraht verkürzt (vgl. Abb. 15). Der Katheter muss an dieser Stelle deshalb verkürzt werden, da der Kleber nicht auf dem Teflon haftet. Beim Verkürzen des Katheters 3mm von der teflonfreien Gitterfläche wird eine Klebestelle für Nadel, Stützdraht und den Katheter geschaffen (Abb. 16). Verkürzen des Katheters zusammen mit dem Stützdraht ist deshalb wichtig, damit der Katheterschlauch durch das Schneiden nicht verengt wird.



Abb. 15: Verkürzen des Katheters mit einem Seitenschneider

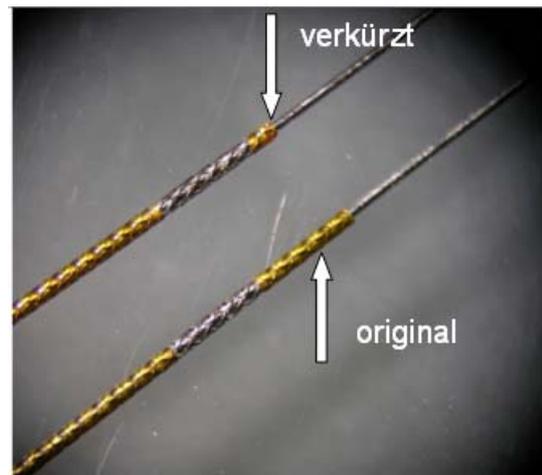


Abb. 16: Vergleich original und verkürzt

2.4.1. Crimpen und Kleben des Katheters mit einer Kanüle

Nachdem der Katheter gekürzt wurde, schiebt man den Setzdraht wieder ca. 1 cm nach der Gitterstelle raus und schiebt ihn in die vorbereitete Kanüle hinein (Abb. 17). Mit Hilfe der Crimpzange wird die Nadel so gecrimpt, dass die Schräge der Kanülenspitze und die gecrimpte Stelle in die gleiche Richtung stehen (Abb. 18). Der Kleber (Cyanolit Crystal Cyanacrylat) wird auf das Braid aufgetragen und zwar an der gelaserten Gitterstelle und zwischen den Katheter und der Kanüle. Durch das Gitter gelangt der Kleber zum Stützdraht.

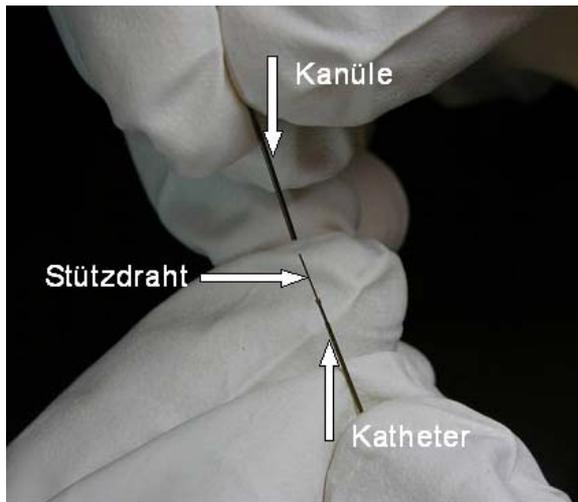


Abb. 17: Einschieben des Stützdrahtes in die Kanüle



Abb. 18: Crimpen der Kanüle

2.4.2. Kleben des Katheters mit einer speziell gefertigten Nadel

Zweite Art der Assemblierung des Braid Katheters war das Kleben mit einer für Joanneum Research speziell gefertigten Vollnadel mit einem Außendurchmesser von 0,5mm der Firma Unimed [Unimed S.A., Lausanne, Schweiz]. Am Verbindungsende der Nadel wurde ein Draht eingeklemmt, eingeklebt und an Joanneum Research geliefert (Abb. 19).

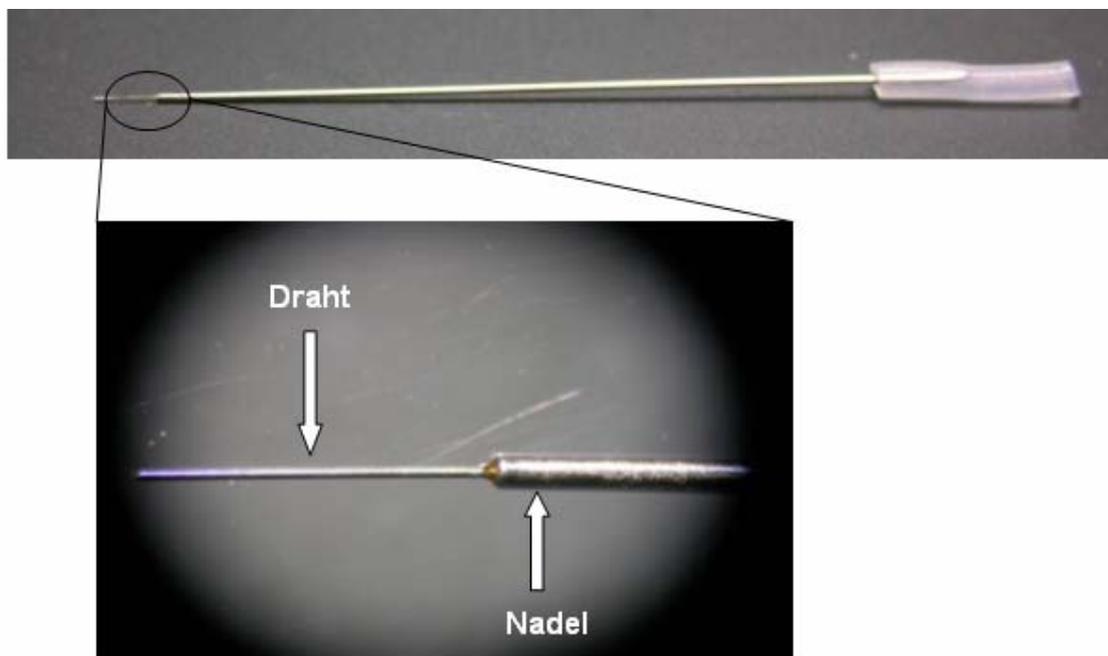


Abb. 19: Unimed Nadel

Methoden

Der Braid Katheter wird an den Nadeldraht herangeschoben (Abb. 20) und der Kleber Cyanacrylat auf das Braid aufgetragen, und zwar an die Gitterstelle (Abb. 21). Durch das Gitter gelangt der Kleber zum Stützdraht des Katheters und verbindet den Nadeldraht mit dem Stützdraht des Katheters. Der Kleber wird auch zwischen Katheter und der Setznadel aufgetragen.

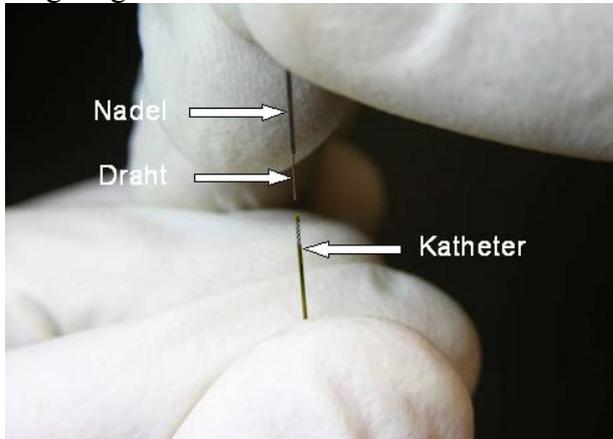


Abb. 20: Einführen der Nadel in den Katheter

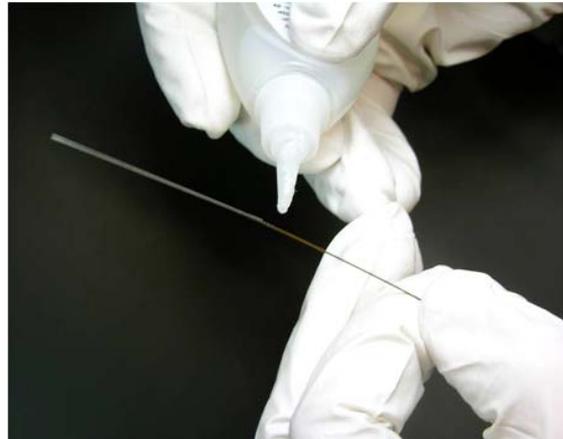


Abb. 21: Kleben der Nadel mit dem Katheter

2.5. Zugversuche

2.5.1. Hintergrund

Um einen sicheren Einsatz des Braid Katheters zu gewährleisten, muss die Reißfestigkeit nach ÖNORM EN 1618:1997¹ getestet werden. Dabei sollen alle Verbindungen zwischen den Anschlüssen geprüft werden. Es wird daher die Fixierung der Nadel, am Katheter und der Katheter selbst überprüft. Auf jedes Prüfstück wird eine Zugkraft solange aufgebracht, bis dieses reißt oder sich eine Verbindung löst. Von dem Institut für Medizinische Systemtechnik und Gesundheitsmanagement wurde eine Abrisskraft von 5 N festgesetzt. Es wurde basierend der Norm EN 1618 eine maximale Zuggeschwindigkeit von 1000mm/min eingestellt². Die Teile des Katheters, die zur Einführung in den Körper bestimmt sind, müssen im Wasserbad für 2h bei einer Temperatur von $37\pm 2^\circ\text{C}$ konditioniert werden. Die Prüfung ist bei diesen Teilen unmittelbar nach der Konditionierung durchzuführen. Der Katheter wird 8,5cm vom Katheterende bzw. 1,5cm vom letzten Markerband abgeschnitten (Abb. 22), da der Katheter bis zum zweiten Markerband (vgl. Abb. 12) in die Haut eingeschoben wird.



Abb. 22: Durchgeschnittener Katheter

Es wurden 50 Katheter getestet. Gemäß ÖNORM ISO ISO 2859-2:1985 bei Ermittlung der Reißkraft der Katheter und der Verbindung Nadel – Katheter dürfen die Katheter erst über 5N reißen und es darf maximal ein fehlerhafter Katheter unter den 50 Stück sein³.

2.5.2. Durchführung

Mit dem Teilstück Katheter-Nadel wurde die Reißfestigkeit der Nadel und Austauschfläche bei 1000mm/min gemessen. Der Experimentablauf wird im Folgenden beschrieben:

1. Die Katheter wurden für 2h bei $37\pm 2^\circ\text{C}$ konditioniert. Für die Konditionierung wurden das Datum (TT.MM.JJ), die Uhrzeit (hh:mm:ss) und die Temperatur ($^\circ\text{C}$) aufgezeichnet. Hierfür wurde folgende Ausrüstung verwendet:
 - Wasserbad + Thermostat,
 - 3-Kanal Timer,
 - Wandfunktuhr,
 - Temperaturlogger Testo + externer Temperaturfühler

¹ ÖNORM EN 1618:1997: Nicht-intravasaler Katheter Prüfverfahren für allgemeine Eigenschaften

² ÖNORM EN 1618:1997; Anhang B: Verfahren zur Bestimmung der Reißfestigkeit; B.3.8

³ ÖNORM ISO ISO 2859-2:1985; Stichprobenplan – Annahmestichprobenprüfung anhand der Anzahl fehlerhafter Einheiten oder Fehler (Attributprüfung) Teil 2

Methoden

2. Die Katheterstücke wurden im Anschluss an die Konditionierung umgehend in die Vorrichtungen des Kraftmessstandes eingespannt und untersucht.
3. Die Vorrichtung mit der Nadel wurde an die Kraftmessdose AFG50N [Mecmesin, Slinfold, United Kingdom] gehängt, die Einspannvorrichtung wurde mit dem anderen Ende des Katheters an die Messvorrichtung angeschraubt (Abb. 23).

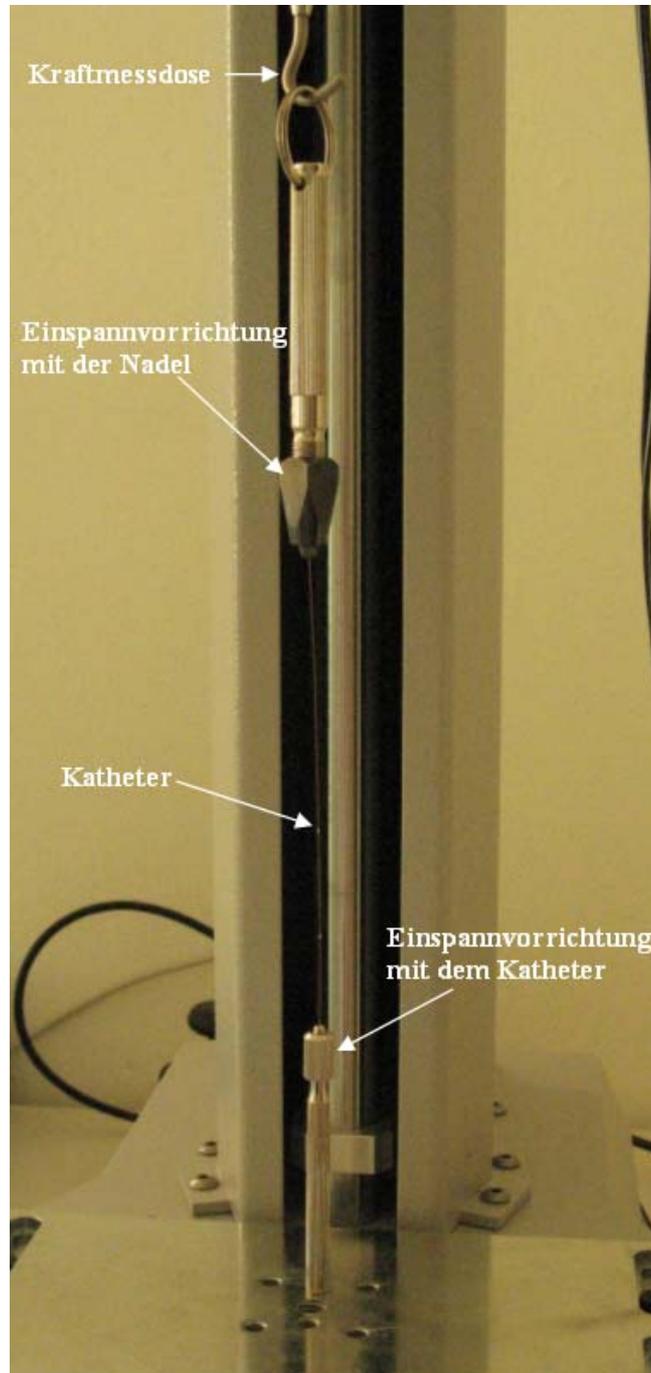


Abb. 23: Eingespanntes Teilstück Katheter-Nadel in die zwei dafür vorgesehenen Klemmzwingen

4. Die Daten wurden über die Kraftmessdose AFG50N über ein Kabel im PC abgespeichert, der Abrisswert der Reißkraft auf der Dose abgelesen und ins Protokoll übertragen.

2.6. Methoden zur Quantifizierung molekularer Substanzen aus dem interstitiellen Raum – Grundlagen der Referenztechniken

Strömt Perfusat durch die Austauschfläche eines Katheters (MD oder OFM) in den interstitiellen Flüssigkeitsraum (ISF), so kommt es vor allem anhand von Diffusionsvorgängen zu einer Vermischung zwischen dem Perfusat und der ISF. Das Resultat dieser Vermischung ist das Rückperfusat, das über ein Samplingsystem (vgl. Abb. 7) in einem Probenvial gesammelt wird. Je nach Eigenschaften des jeweiligen Katheters, des Gewebes sowie der Flussgeschwindigkeit befinden sich in dem gesammelten Rückperfusat (Sample) ein Gemisch aus dem Perfusat und der ISF. Jedoch ist es noch nicht möglich den Vermischungsgrad oder Äquilibrationsgrad (engl. „Recovery“) zu bestimmen. Die Höhe der Absolutkonzentration im Gewebe kann im Allgemeinen nicht aus der Konzentration in der gesammelten Probe bestimmt werden. Dazu sind Verfahren notwendig, mit denen man aus der Konzentration der Probe die Konzentration der ISF bestimmen kann.

Zur Bestimmung von Konzentrationen im Gewebe ohne Zuhilfenahme weiteren Substanzen (sog. Referenzsubstanzen) gibt es mehrere bekannte Verfahren:

- „No Net Flux“ Protokoll (NNF): Mehrere Perfusionslösungen verschieden hoher Konzentrationen werden durch den Katheter in das Gewebe perfundiert. Der Verlust bzw. Gewinn an den Konzentrationen aus dem Gewebe wird bestimmt und gemittelt. Die erhaltenen Werte werden anschließend in einem Graphen, bei dem auf der y-Achse nach oben der Gewinn, nach unten der Verlust und auf der x-Achse die Perfusatkonzentration stehen, eingetragen. Durch den Schnittpunkt der linearen Regressionsgerade der gemittelten Punkte mit der x-Achse erhält man die Konzentration in der ISF ($C_{\text{Perfusat}} = C_{\text{ISF}}$) [21].
- „Zero Flow Rate“ Protokoll: Die Perfusionslösung wird mit einer hohen Flussrate durch den Katheter gepumpt, was die Konzentration verdünnt. Die Flussrate wird bis gegen „Null“ erniedrigt, was eine Erhöhung der Konzentrationen bewirkt. Da man mit „Null“ Flussrate nicht perfundieren kann, wird anhand der erhaltenen Werte mittels Interpolation der wahre Wert bestimmt.
- „Rezirkulation“: Ein konzentrationfreies Perfusat wird durch das Gewebe solange „rezirkuliert“ bis der erhaltene Wert einen konstanten Wert erreicht. Die konstante Konzentration entspricht der Konzentration in der ISF.

Nachteilig bei diesen drei Methoden ist einerseits der hohe Arbeits- und Zeitaufwand, andererseits muss die Annahme getroffen werden, dass die Recovery nach einer Einlaufzeit konstant bleibt. Diese Methoden erlauben daher nur die Bestimmung einer unveränderlichen Konzentration und werden meist nur für Kalibrierungszwecke eingesetzt [8; 9].

Die internen [13] und externen [14] Referenztechniken sind sowohl bei der MD als auch bei der OFM anerkannte Methoden zur Quantifizierung. Mit diesen Methoden ist es möglich für jede Probe die Höhe der Recovery zu bestimmen und somit auf die Höhe der Konzentration der gesuchten Substanz im Gewebe rückzurechnen. Im Vergleich zu erstgenannten Verfahren ist die Erfassung von veränderlichen Konzentrationen möglich. Bei der „internen Referenztechnik“ wird dem Perfusat eine Markersubstanz bekannter Konzentration beigegeben. Der Grad der Vermischung (Reverse Recovery) kann Anhand des prozentuellen Verlustes der Markersubstanz nach Passieren der Katheteraustauschfläche gegenüber ihrer Ausgangskonzentration im Perfusat bestimmt werden:

Methoden

$$\text{Recovery}_{\text{inv}} [\%] = \frac{C_{\text{Perfusat}} - C_{\text{Out}}}{C_{\text{Perfusat}}} * 100 \quad (1)$$

$\text{Recovery}_{\text{inv}} [\%]$ - Inverse Recovery in Prozent

C_{out} - Konzentration des Stoffes in der gesammelten Probe (Rückperfusat)

C_{Perfusat} - Konzentration des Stoffes im Perfusat

Hingegen befindet sich bei der „externen Referenztechnik“ die Referenzsubstanz in der umgebenden ISF des Gewebes, also katheterextern und ist idealerweise schon bekannt oder kann laufend ermittelt werden. Somit kann die Recovery aus der vorhandenen Konzentration der Probe berechnet werden (7).

Die Recovery einer Substanz „X“ (2) ist definiert als das Verhältnis der Konzentration in der gesammelten Probe C_{outX} zur Absolutkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit C_{ISF} wobei die Konzentration der Probe C_{outX} bestimmt werden kann. Jedoch in der Regel ist die Absolutkonzentration C_{ISF} meist unbekannt oder schwer zugänglich.

$$\text{Rec}_X = \frac{C_{\text{outX}}}{C_{\text{ISFX}}} \quad (2)$$

Rec_X - Recovery der Substanz ‚X‘

C_{outX} - Konzentration des Stoffes ‚X‘ in der gesammelten Probe (Rückperfusat)

C_{ISFX} - Absolutkonzentration des Stoffes ‚X‘ in der interstitiellen Flüssigkeit (ISF)

Ist die Konzentration der gesuchten Substanz in der gesammelten Probe durch die Laboranalyse ermittelt und die Recovery bekannt, so kann die Gleichung (2) umgeformt und die ISF Konzentration der zu bestimmenden Substanz (Quantifizierung) berechnet werden, wie in (3) dargestellt.

$$C_{\text{ISFX}} = \frac{C_{\text{outX}}}{\text{Rec}_X} \quad (3)$$

Die Recovery der zu bestimmenden Substanz ist meist nicht bekannt und muss zuvor erst bestimmt werden. Dazu wird auf eine Referenzsubstanz zurückgegriffen, welche ein ähnliches Verhalten beim Sampling aufweist, wie die zu bestimmende Substanz. Wenn möglich, soll die Referenzsubstanz gleiche Molekulargröße und Diffusionseigenschaften besitzen. Die Absolutkonzentration dieser Referenzsubstanz ist entweder im Idealfall konstant und bekannt oder kann leicht über eine Messung an einem Ort im Körper bestimmt werden. Sind diese Voraussetzungen experimentell erfüllt, so kann man davon ausgehen, dass die beiden Recoveries der Referenzsubstanz und der zu bestimmenden Substanz gleich sind (4):

$$\text{Rec}_X = \text{Rec}_{\text{Ref}} \quad (4)$$

Rec_X - Recovery der zu bestimmenden Substanz ‚X‘

Rec_{Ref} - Recovery der bekannten bzw. messbaren Referenzsubstanz

Kombiniert man die Gleichung (2) und Gleichung (4), so erhält man die Gleichung (5), bei der die Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz auf der linken und die Konzentrationen der Referenzsubstanz auf der rechten Seite stehen.

$$\frac{C_{out X}}{C_{ISF X}} = \frac{C_{out Ref}}{C_{ISF Ref}} \quad (5)$$

$C_{out X}$ - Konzentration der zu bestimmenden Substanz ‚X‘ in der gesammelten Probe

$C_{ISF X}$ - Konzentration der zu bestimmenden Substanz ‚X‘ in der ISF

$C_{out Ref}$ - Konzentration der Referenzsubstanz in der gesammelten Probe

$C_{ISF Ref}$ - Konzentration der Referenzsubstanz in der ISF

Ist die Recovery der Referenzsubstanz bekannt, so kann die Absolutkonzentration berechnet werden. Dadurch lässt sich (5) vereinfachen und (3) in (6) umformen, mit der Recovery der Referenzsubstanz und der Konzentration der zu messenden Substanz in der gesammelten Probe auf der rechten Seite.

$$C_{ISF X} = \frac{C_{out X}}{Rec \cdot Ref} \quad (6)$$

2.6.1. Ionenreferenzmethode

Als Referenz zur interstitiellen Messung der Kleinmoleküle wurde die „Ionenreferenzmethode“ verwendet. Dabei perfundiert durch den Katheter ein ionenfreies Perfusat, was das Bestimmen der Ionenkonzentration der gesammelten Probe deutlich vereinfacht. Wird ein Katheter mit einem ionenfreien Perfusat perfundiert, so treten die Ionen aus dem interstitiellen Raum bzw. Gewebe durch die Austauschfläche des Katheters in das ionenfreie Perfusat ein. Ionen wie z.B. Natrium (Na) und Kalium (K) eignen sich als Referenz-Ionen, bzw. Marker zur Bestimmung der Recovery besonders gut, weil die Natrium Konzentration extrazellulär und Kalium Konzentration intrazellulär (Na-K-Pumpe) hochkonstant und bekannt ist. Die Absolutkonzentration von Natrium lässt sich zusätzlich aus dem Blutplasma bestimmen. Die Ionenreferenzmethode wird nicht nur zur Quantifizierung kleiner (Medikamenten-) Moleküle in der Haut verwendet, sondern wird auch zur Quantifizierung von Glukose im Gewebe eingesetzt.

$$Recovery [\%] = 100 * \frac{Na_{Sample}}{Na_{Plasma}} \quad (7)$$

2.6.2. Inulin und Albumin als externe Referenzsubstanzen

Eine Methode der „Externen Referenztechnik“ zur Bestimmung und Überprüfung der Wiederfindungsrate von Makromolekülen ist kontinuierliche (intravenöse) Verabreichung von Inulin, während des jeweiligen Versuches. Inulin, als ein Gemisch von Polysacchariden aus Fructosemolekülen, wird vom Körper nicht abgebaut und daher bei kontinuierlicher iv. Infusion mit ISF als interne Substanz komplett ausgeglichen. Deswegen kann Inulin als

externe Referenz für Wiederfindungsrate verwendet werden [15]. Eiweiß Albumin, als großmolekulare Substanz befindet sich bis zu 15% im subkutanem interstitiellen Flüssigkeitsraum, im Vergleich zur absoluten Serumkonzentration [16]. Durch Verwendung des Albumins als externen Referenzsubstanz soll der Nachweis von großmolekularen Substanzen untersucht werden.

2.7. *In vitro* Flussratenbestimmung

Bei den *in vitro* Versuchen wird das gesamte Versuchsssetup für *in vivo* Tierversuche aufgebaut und getestet, mit dem Ziel, alle vorkommenden Hindernisse bezüglich des Systems vor dem Tierversuch zu korrigieren und während des Versuches zu vermeiden. Um die geplante Flussrate für den jeweiligen Tierversuch zu erreichen, wird die Pumpeneinstellung aufgrund der Herstellungstoleranzen der Pumpschlauchinnendurchmesser für die verwendeten Schlauchchargen untersucht. Das OFM Fluss - System wurde wie in der Abb. 7 aufgebaut und betrieben.

Die Probenvials wurden vor dem Versuchsstart etikettiert, mit Parafilm abgedeckt und mit einer Feinwaage (fünf Dezimalstellen) abgewogen. Die Abdeckung mit Parafilm diente zum Schutz des Probeninhaltes, und um eine Verdampfung bei Raumtemperatur zu vermeiden. Somit wird auch gewährleistet, dass die Pumpeneinstellung für die gefragte Flussrate präzise ermittelt werden kann. Für die Berechnung der Umdrehungszahl der Pumpe wird das Gewicht der gesammelten Probenflüssigkeit nach einer Sammelperiode herangezogen (Berechnung siehe 3.3). Die Schläuche (bezeichnet als ofm1 und ofm2) wurden in die Pumpe eingelegt (Abb. 26). Das Schlauchende, das auf der Saugseite der Pumpe lag, gelang in das Falcon Tube, in dem sich die Perfusionslösung befand. Am anderen Ende der Schläuche (auf der Push Seite der Pumpe) sind die Edelstahlröhrchen zum Teil in die Schläuche eingeführt worden (jeweils eins pro Schlauch), (vgl. Abb. 24). Die Röhrchen stach man durch den Parafilm ein, wodurch eine Verbindung mit den Vials (Sammelbehältnis) entstand (vgl. Abb. 25). Durch das Pumpen wurde das Perfusat weitergeführt und über den Pull-Zweig im Sammelbehältnis (Vial) gesammelt.

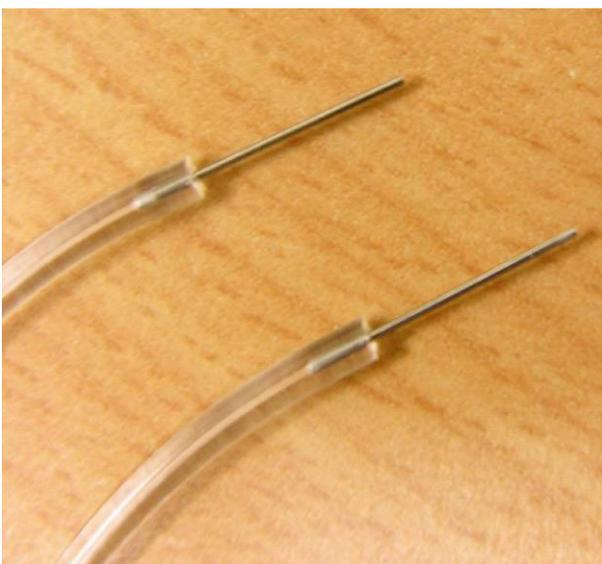


Abb. 24: Edelstahlröhrchen in den Schläuchen

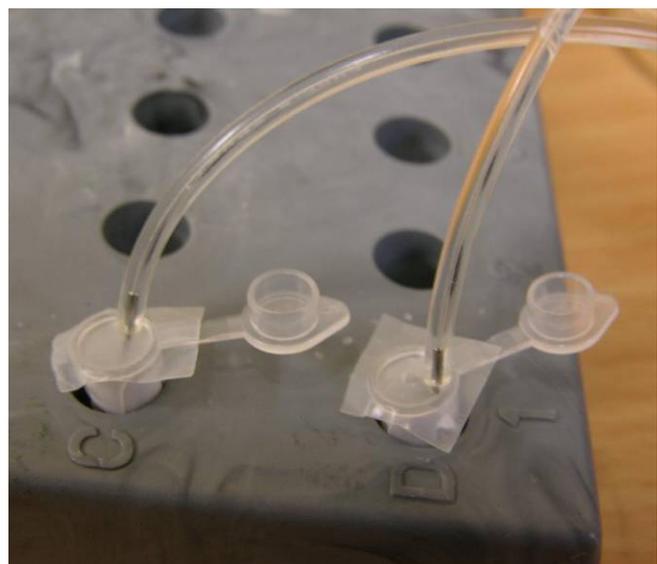


Abb. 25: Sammeln der Proben (Sampling)



Abb. 26: Typischer in vitro Versuchsaufbau

Der typische in vitro Versuchsaufbau ist in der Abb. 26 zu sehen. Man sieht die Schläuche ofm1 und ofm2, die in die Peristaltikpumpe eingelegt sind und das Perfusat (rechts). Die oben beschriebenen Stahlröhrchen werden links in den Parafilm eingestochen. Es wurden 80cm lange Tygon® Tubing ID 0,19mm Schläuche von Cole-Parmer [Cole-Parmer Instrument Company Ltd., Hanwell, London, United Kingdom] verwendet, mit dem Innendurchmesser (ID) 0,19mm und mit ID 0,25mm. Die Vials wurden im Intervall von einer Stunde gewechselt und nach dem Wechsel mittels Feinwaage abgewogen. Zuerst stellte man die Pumpe beliebig ein, um die präzise Einstellung für die entsprechende Flussrate nach dem Abwiegen zu berechnen.

2.8. In vivo Rattenversuche

Die Rattenversuche wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung gemäß Tierversuchsgesetz (BGBl. Nr.501/1988 i.d.g.F.) genehmigt. Geschäftszahl: BMWF-66.010/0051-II/10b/2008; Abteilung: II/10b.

Alle Tierversuche wurden entsprechend dem Tierversuchsgesetz (TVG), Bundesgesetz vom 27. September 1989 über Versuche am lebenden Tieren BGBl. I Nr. 162/2005 (NR: GP XXII RV 993 AB 1252 S. 132. BR: 7440 AB 7446 S. 729), durchgeführt.

2.8.1. Art der Versuchstiere

Bei den Rattenversuchen wurde der Braid Katheter das erste Mal in einem Tiermodell eingesetzt. Die zu überprüfende Aspekte bei dieser Versuchsreihe waren:

- das Handling des Katheters
- die Problematik des Setzens
 - wie leicht kann der Katheter in die Haut eingebracht werden?
 - hält die Nadelverbindung beim Setzen?
 - ist das Setztrauma minimal?
- Kontaktieren des Katheters mit den Pumpschläuchen:
 - sind die Verbindungen dicht?
 - wird das System problemlos perfundiert?

Weiters wurde kontrolliert, wie sich die Flussraten mehrerer Katheter zueinander verhalten, und anhand der gewonnenen Daten wurde der Katheter evaluiert und weiterentwickelt.

Für die Durchführung des Versuches wurden adulte männliche Wistar Ratten der Firma Harlan Winkelmann [Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland], mit einem Gewicht von ca. 300g (± 50 g) verwendet, deren Gesundheitszustand einwandfrei war. Die Wistar Ratten als Versuchstiere sind besonders gut geeignet, da es sich um einen Albino-Inzuchtstamm handelt, welcher geringe DNA Unterschiede innerhalb einer Population hat. Die Tiere wurden an das Institut für Biomedizinische Forschung (Hahnhof) der Medizinischen Universität Graz eine Woche vor Versuchsbeginn geliefert und dort bis zum jeweiligen Versuchstag unter Standardbedingungen gehalten und gepflegt. Somit hatten die Tiere genug Zeit, sich an das Personal und die neue Umgebung zu gewöhnen. Da die Versuche auch in den Räumlichkeiten des Institutes stattgefunden haben, wurde der Stress, dem die Tiere durch den Transport und die neue Umgebung ausgesetzt waren, minimiert.

Futter und Wasser: ad libitum

Haltung: in Gruppen von 2 Ratten pro Käfig im klimatisierten Raum

Temperatur: 20-24°C

Licht Zyklus: Die Beleuchtung in der Tierhaltung unterliegt einem automatischen 12 Stunden Tag/ 12h Nacht-Zyklus (unter Zeitschaltuhr; Lichtschalter: Ein/Aus). 6-18 Uhr (Sommerzeit)/ 7-19 Uhr (Winterzeit).

Luftfeuchtigkeit: 50-60%

Ventilation: 10-20 Umwälzung des Raumvolumens/Stunde

12 Stunden vor dem Beginn des Versuches bekommen die Tiere kein Futter, womit sichergestellt wird, dass die Tiere am Folgetag nüchtern sind. Da die Dosierung des Narkotikums vom Körpergewicht des Versuchstieres abhängig ist, war diese Maßnahme

notwendig. Zusätzliches Gewicht durch Futter im Magen könnte zu einer falschen Verabreichung und somit einer Überdosierung des Narkotikums führen.

2.8.2. Vorbereitung und Narkose der Versuchstiere

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen. Pro Versuchstag wurden 2 Ratten behandelt. Die unternommenen Maßnahmen zur Narkose und Behandlung der Versuchstiere sind im Folgenden beschrieben:

Einleitung der Narkose

Die Tiere wurden mittels des Inhalationsanästhetikums Isofluran [Abbott Laboratories, Illinois, USA] mit reinem Sauerstoff als Trägergas narkotisiert. Die Einleitung erfolgte in einer Induktionskammer [Rothacher Medical GmbH, Bern, Schweiz], die auf einer Seite den Normanschluss für die Narkoseeinspeisung (Combi- vet®- Anästhesiegerät inklusive elektronischem Durchflussmesser und Verdampfer, Fa. Rothacher), sowie auf der anderen Seite den Anschluss für den Narkoseabgang aufweist.

Die Durchflussrate betrug 4 Vol% Isofluran und 1,5 l Sauerstoff/min.

Aufrechterhaltung der Narkose

Nachdem die Ratte zum Einschlafen gebracht wurde, wurde sie aus der Induktionskammer entnommen, am Rücken liegend auf einer Kleintier-Heizmatte positioniert und an eine Narkosemaske, welche einen stabilen Durchfluss von Sauerstoff und Isofluran sicherstellt, angeschlossen. Die Durchflussrate von Isofluran wurde, je nach Bedürfnis auf 1,5 bis 3 Vol% reduziert.

Mittels eines zusätzlichen, an die Narkoseeinheit angeschlossenen Befeuchtersystems (Vernebelung von sterilem Wasser – dem Aqua bidest) wurde einer potentiellen Austrocknung der Atemwege oder Lunge entgegengewirkt. Zur Überprüfung bzw. Regulierung der Körpertemperatur wurde ein Rektalthermometer verwendet, das direkt mit einem Temperaturkontrollgerät inkl. Heizmatte [TSE-Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland] verbunden ist. Somit wurde ein Absinken der Körpertemperatur vermieden. Um ein Austrocknen der Hornhaut der geöffneten Augen zu verhindern, wurde Vidisic®-Augengel auf die Augen vor der Narkose aufgetragen.

Die Tiere wurden, nachdem sie vorbereitet und narkotisiert wurden, auf dem Rücken gelagert und im Bereich der Applikationsflächen mit einem Elektrorasierer rasiert, wobei besonders darauf geachtet wurde, die Haut nicht zu verletzen. Während des Versuches wurde immer zwischendurch die Tiefe der Narkose überprüft, indem man den Tieren mit einer Pinzette die Haut zwischen den Hinterbeinen „kneifte“ und dadurch die Muskelreflexe überprüfte.

Sakrifizierung

Am Ende des Experimentes wurden die in Narkose befindlichen Tiere durch eine Guillotine sakrifiziert.

2.8.3. Versuchsdurchführung

Damit die Katheter möglichst präzise implantiert werden konnten, wurden die geplanten Ein- und Austrittsstellen, sowie die Mitte, mit einem OP Hautmarkierungsstift markiert (vgl. Abb. 28). Pro Ratte wurden die Braid Katheter (Abb. 12) in 2 Flächen im 30mm Abstand gesetzt, mit jeweils 3 Mikroperfusionskathetern, die im Abstand von 5mm intrakutan gelegt wurden (Abb. 27).

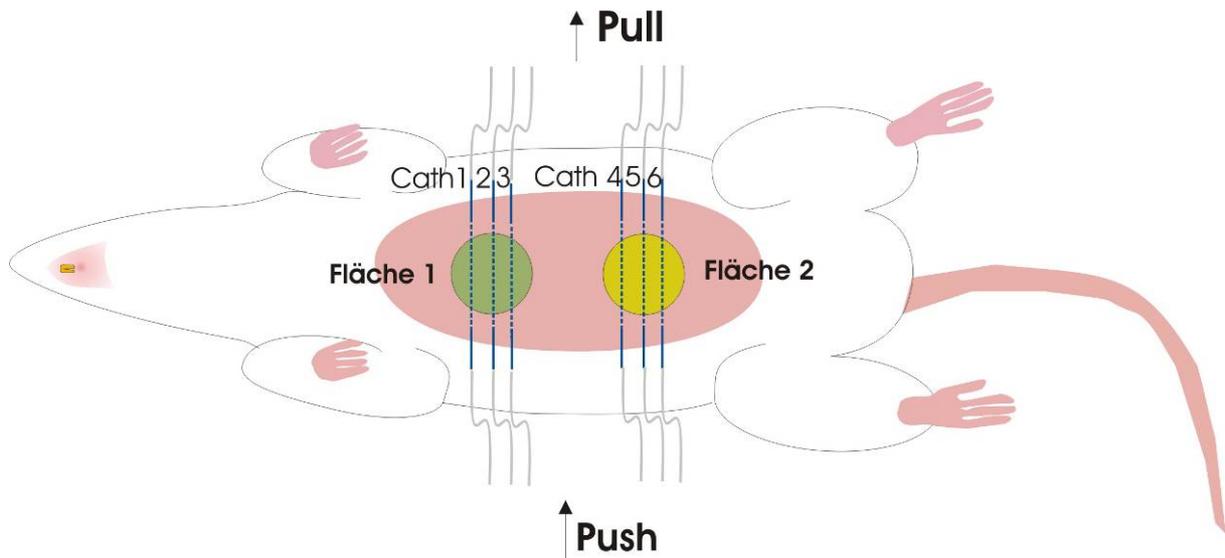


Abb. 27: Schematische Anordnung und Anzahl der sechs Katheter

Die Katheter wurden mittels einer Führungskanüle (\varnothing 0,5mm) innerhalb der Dermis (Tiefe ca. 1mm) mittels Nadelhalter über eine Strecke von ca. 30mm geführt (vgl. Abb. 27) und der daran angebrachte Katheterschlauch (\varnothing 0,4mm) - einem Faden gleich - in die Haut gezogen (Abb. 28). Die Setznadel wurde soweit aus der Haut gezogen, bis die weißen Ringe (Marker Band) am Braid Katheter (Abb. 29) nahe Ein- und Austrittsstellen lagen, womit sichergestellt war, dass sich die Austauschfläche des Katheters zur Gänze in der Dermis der Haut befindet. Die Katheter wurden an Ein- und Austrittsstellen auf der Haut mit einem Kleber (Cyanacrylat) verklebt, um das Verrutschen der Katheter und somit Herausrutschen der Austauschfläche zu vermeiden und diese Stellen abzudichten (Abb. 32).

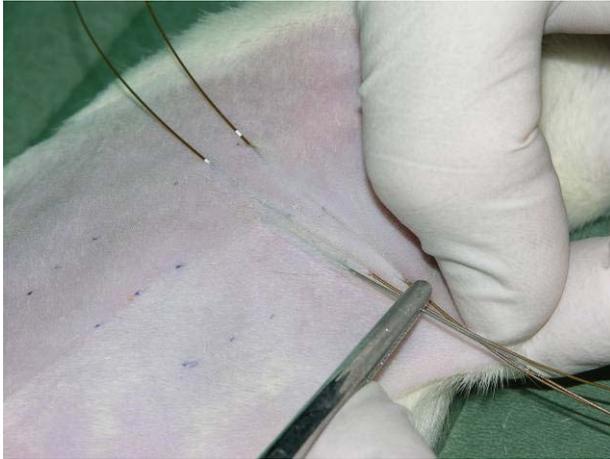


Abb. 28: Intradermale Implantation mittels einer steifen Setznadel und Nadelhalter



Abb. 29: Implantierte Setznadel

Nach dem Implantationsvorgang wurden die Zu- und Abgänge der Katheter über kleinlumige Schläuche eingangsseitig (Push) mit einer gepufferten Infusionslösung (Perfusat) und ausgangseitig (Pull) mit einem Sammelgefäß verbunden und wie in der Abb. 7 gezeigt perfundiert. Über zwei Peristaltikpumpen wurden die Katheter in der Haut mit Perfusat bei kleiner Flussrate von $1\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert und es wurde darauf geachtet, dass sich das gesamte System mit der Perfusionslösung füllt. Eine Pumpe diente zum Antrieb des Perfusates durch das System (Push-Seite), die andere dagegen diente dem Absaugen des Rückperfusates in das Vial (Pull-Seite). Um ein Unterdruck zu vermeiden, wurde die Push Pumpe auf 0,24 und die Pull Pumpe auf 0,25 – 0,26 Umdrehungen/min eingestellt (Abb. 7). Nach einer Einlaufzeit von ca. 1 Stunde, in der dem betroffenen Gewebe die Möglichkeit gegeben wurde, sich von dem Setztrauma zu erholen [17] und nach Sicherstellung, dass das System konstant und ohne Luftblasen perfundiert wurde, konnte mit dem Versuchsprotokoll, bzw. Sampling begonnen werden (Abb. 30). Da die gewonnenen Proben in der Größenordnung von $100\mu\text{l}$ sind, wurden die Sammelbehältnisse (Vials) mit Parafilm abgedeckt, um den Inhalt der Proben zu sichern und eine Verdampfung durch die Raumtemperatur zu vermeiden. Die Probe jedes Katheters wurde in einem eigenen Sammelbehältnis (Vial) gesammelt. Wie in Abb. 30 gezeigt, wurden die Sampels in Intervallen von 60 Minuten als einzelne Proben in Vials gesammelt, abgewogen und bei -24°C zwischengelagert. Bei einer Flowrate von $1\mu\text{l}/\text{min}$ und der Dauer von 60 Minuten ergab sich ein Probenvolumen von $60\mu\text{l}$ pro Fraktion, bzw. Probenvial. Nach Beendigung des Versuches wurden die Probenvials ins Labor gebracht, wo sie bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt wurden.

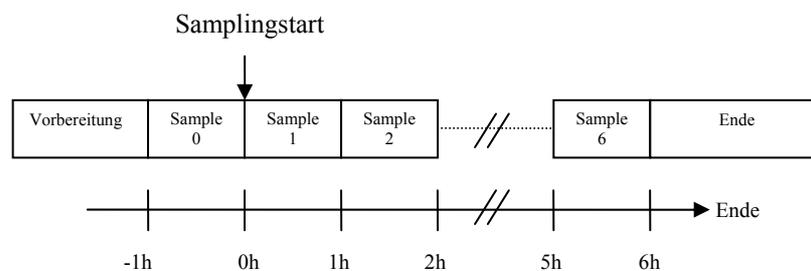


Abb. 30: Zeitlicher Ablauf des Versuches



Abb. 31: Versuchsaufbau: Geräte und Versuchsssetup



Abb. 32: Versuchsaufbau: Narkotisierte Ratte und Versuchsssetup

Der typische Versuchsaufbau ist auf der Abb. 31 und Abb. 32 zu sehen. Die Ratte liegt auf einer Heizmatte, die aus Hygienegründen mit Zellstoff bedeckt wurde, deren Temperaturregulation über Rektalthermometer (blau) mit dem Temperaturkontrollgerät erfolgte. In Abb. 31 erkennt man 2 Peristaltik Pumpen (Push, Pull), Falcon Tube mit dem Perfusat auf der rechten (Push) Pumpe und Kryogenbox mit Probenvials neben der linken (Pull) Pumpe. Hinter den Pumpen ist die Narkoseeinheit zu sehen mit der Regulation für Sauerstoff (betrug meist 1,5 l/min) und Isofluran (betrug meist 2-3 Vol %). Zwischen den beiden Pumpen oben befindet sich der Luftbefeuchter der Narkoseeinheit, unten der Schlauch, der das befeuchtete Gasmisch zur Maske führt, die anschließend an die Nase der Ratte angelegt wird.

Pro Versuchstag wurden 2 Ratten behandelt, die als Subjects (S) bezeichnet und mit einem Stift nummeriert wurden. Wie man in der Abb. 32 erkennt, wurde die Ratte an den Zellstoff mit Seidenpflaster befestigt und während des Versuches wurde mit der Pinzette die Tiefe der Narkose überprüft.

2.8.4. Materialien und Hilfsmittel

a) Hauptbestandteile der Fluidik:

- 4 Peristaltik Pumpen (Minipulse 3, Gilson, 4 Kanal)
- Tygon®Schlauch Sets für OFM (ID 0.19mm, Push 80cm, Pull 80cm)
- Perfusat Reservoirs (14ml Falcon Tubes)
- Beschriftete und gewogene Maximum Recovery Vials (mit Parafilm verschlossen) zum Sammeln des Rückperfusates
- OFM Braid Katheter
- Perfusat (0,5% HSA (human serum albumin) in PBS (phosphate buffered solution))

b) Hilfsmittel für das Setzen und Kontaktieren der Katheter

- OP Hautmarkierungsstift
- Lineal
- Div. Nadelhalter
- Div. Pinzetten
- Schere
- 3M Durapore hypoallergenes Seidenpflaster

c) Hilfsmittel für die Vorbereitung und Behandlung der Tiere beim Versuch

- Elektrischer Haarschneider
- Tupper und div. Einmalartikel
- Alkohol zum Desinfizieren (Skinsept® pur Ecolab GmbH)
- Div. Spritzen und Kanülen
- NaCl- und Ringer- Lösung
- Induktionskammer und Narkosespeisungseinheit mit Sauerstoff und Isofluran
- Kleber Cyanacrylat
- Temperaturkontrollgerät inkl. Heizmatte (Fa. TSE-Systems) mit Rektalthermometer
- Aqua bidest
- Zellstoffunterlagen

d) Hilfsmittel für das Sampling

- Kryogenboxen
- Feinwaage für gesammelte Proben
- Gefrierschrank
- Div. Spritzen und Kanülen
- Div. Schreibunterlagen und Etiketten
- Versuchsprotokoll und Formulare
- Stifte
- Stoppuhr

2.9. In vivo Schweineversuche

Die Schweineversuche wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung gemäß Tierversuchsgesetz (BGBl. Nr.501/1988 i.d.g.F.) genehmigt. Geschäftszahl: BMWF-66.010/0065-II/10b/2008; Abteilung: II/10b.

Alle Tierversuche wurden entsprechend dem Tierversuchsgesetz (TVG), Bundesgesetz vom 27. September 1989 über Versuche am lebenden Tieren BGBl. I Nr. 162/2005 (NR: GP XXII RV 993 AB 1252 S. 132. BR: 7440 AB 7446 S. 729), durchgeführt.

2.9.1. Art der Versuchstiere

Bei der Schweineversuchsreihe wurde die Performance der OFM Katheter mit MD Kathetern verglichen und für Anwendungen im Bereich der klinischen Forschung getestet und evaluiert. Das Versuchsziel war, die Austauscheffizienz von verschiedenen Kathetertypen zu vergleichen. Die Austauscheffizienz ist eine wichtige Eigenschaft eines Katheters sowohl für das erfolgreiche Sampling in der Haut, als auch im subkutanen Fettgewebe und wird über die Wiederfindungsrate (engl. Recovery) bestimmt. Ein Qualitätskriterium ist bei gegebenem Sampling – Flow (Perfusat/Rückperfusat) durch den Katheter eine möglichst hohe und stabile Wiederfindungsrate (Recovery) zu erreichen. Die möglichst geringe Invasivität bzw. eine geringe Gewebebeeinträchtigung durch den Setzvorgang stellt ein weiteres Kriterium dar. Um die MD und OFM Katheter miteinander zu vergleichen, werden die Flussraten und die Wiederfindungsrate der einzelnen Katheter verglichen. Drei Substanzen mit verschiedenen Molekulargewichten wurden ausgewählt, um die Austauscheffizienz der verschiedenen Katheter zu vergleichen:

- Ionen (Na, K), als kleinmolekulare Substanzen
- Inulin, als mittelmolekulare Substanz
- Albumin, als großmolekulare Substanz

Bei dem Tierversuch wurden nur Tiere verwendet, deren Gesundheitszustand einwandfrei war. Da es bei dieser Versuchsreihe um den Vergleich der Katheter, sowohl untereinander, als auch der Performance der einzelnen Katheter geht, ist es von grundsätzlicher Wichtigkeit, die Katheter in das gleiche Tier zu setzen. Da der Braid Katheter zukünftig in klinischen Studien an Menschen bei einer topischen Applikation von aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt wird, ist eine vergleichbare Penetrationseigenschaft ein wichtiges Kriterium. Wegen der Größe des Tiermodells und der Ähnlichkeit mit der humanen Haut, hinsichtlich der Penetrationseigenschaften [20], ist das Schwein als Versuchstier am besten geeignet. Die Tiere werden 4-7 Tagen vor dem jeweiligen Versuch an das Institut für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz (Hahnhof) geliefert. Nach der Anlieferung werden die Tiere in die Schweinebox gesetzt und unter Standardbedingungen am Institut gepflegt, um sich an das Personal und die neue Umgebung zu gewöhnen. Durch eine Eingewöhnungszeit von ca. einer Woche wird so der Stress durch den Transport und Aussetzung einer neuer Umgebung minimiert. Die Versuchstiere werden am Tag des jeweiligen Versuches vom Institut für Biomedizinische Forschung nach einer Grunduntersuchung an die Sektion für Chirurgische Forschung der Universitätsklinik für Chirurgie am LKH Graz geliefert.

12 Stunden vor dem Beginn des Versuches bekommen die Tiere kein Futter, womit sichergestellt wird, dass die Tiere am Folgetag nüchtern sind. Da die Dosierung des Narkotikums vom Körpergewicht des Versuchstieres abhängig ist, war diese Maßnahme

notwendig. Zusätzliches Gewicht durch Futter im Magen könnte zu einer falschen Verabreichung und somit einer Überdosierung des Narkotikums führen.

2.9.2. Vorbereitung und Narkose der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach dem Abwiegen narkotisiert. Da es sich um größere Tiermodelle (40-60kg) handelt, ist die Narkotisierung dementsprechend aufwändiger und benötigt ein qualifiziertes Personal. Während der ganzen Versuchsreihe wurden die Tiere vom Team der chirurgischen Forschung und Vorhandensein einer geschulten Veterinärin narkotisiert und behandelt. Die Maßnahmen zur Narkose und Behandlung der Versuchstiere werden im Folgenden beschrieben:

Prämedikation

Die Prämedikation soll ca. 15 Minuten vor dem geplanten Venenweg intramuskulär verabreicht werden und für ein 30 kg Schwein sich wie folgt zusammensetzen:

- 0,3mg/kg Diacepam (Gewacalm®)
- 1-2 mg/kg Azaperon (Stresnil®)
- 10-16 mg/kg zu 500 mg Ketamin (Ketasol®)

Bei unzureichender Sedierung (z. B. Fehlpunktion oder Verlust der Kanüle) muss die Prämedikation mit der ½ Dosis wiederholt werden.

Einleitung der Narkose

Nach ausreichender Hautdesinfektion soll ein Venenweg 1,0 rosa gelegt werden.

Bei ausreichender Sedierung wird der Venenweg entweder in der Box, am Boden oder bereits am OP-Tisch an einer Ohrvene gelegt.

Nach ausreichender Präoxygenierung soll die Einleitung wie folgt stattfinden:

- Fentanyl 2-3 µg/kg KG
- Propofol 1% (Diprivan ®) 3 mg/kg KG Bolus
- Intubation: Spiraltubus 6,0 - 7,0 ID, langer Millerspatel, Mandrin
- Cis-Atracurium (Nimbex ®) 0,15 mg/kg KG Bolus (nach der erfolgreich überprüften Intubation)

Beatmung (35 kg)

Die Beatmung soll mit einem Tubus 6.0 - 7,0 Spiral, mit IPPV/PCV, Ratio 1:2 mit einem AZV von 10 ml/kg KG bei einer Atemfrequenz von 20-22/min mit Peep 3 durchgeführt werden. Die genaue Anpassung erfolgt über die Messung des endtidalen CO₂.

Aufrechterhaltung der Narkose

Zur Aufrechterhaltung der Narkose sind 2 Venenwege erforderlich, wobei über einen Venenweg Volumen verabreicht werden soll, der zweite zur Aufrechterhaltung der Narkose (TIVA mit Propofol und Fentanyl) dient. An Volumen sollen circa 10 ml/kg KG/h in der 1. Stunde, dann 3 ml/kg KG/h weiter wie folgt verabreicht werden:

Volumen:

- Elo-Mel Isoton 500ml
- Ringer 500 ml
- Weiter mit Ringer falls erforderlich

Methoden

- Fakultativ Voluven 6% 500ml
Perfusoren: Fa. Braun Secura FT und Combimat 2000
- Propofol (Diprivan®) 1% 6-10 mg/kg KG/h
Wahlweise:
- Sevoflurane (SEVOfluran®) 2% ET statt Propofol wie oben angeführt

Monitoring

Das Monitoring soll während der gesamten Narkose wie folgt durchgeführt werden:

- Pulsoxymetrie am Schwanzstummel
- Blutdruck invasiv (nach EL, während Aufrechterhaltung) art. femoralis sinister sive dexter
- Kapnometrie
- BZ Kontrollen mit BGA/OP-Profil nach Bedarf, wahrscheinlich 1-2 stündlich
- Temperatursonde rektal oder oral
- EKG falls Herzfrequenz über Pulsoxymetrie oder art. Blutdruck nicht ausreichend sein sollte

Ausrüstung und Bedarfsmedikation

Narkosemaschine: Siemens Servo

Cardiicap Datex für art. RR

Perfusoren: Fa. Braun Secura FT und Combimat 2000

Vaporen: Draeger

Blutgasanalyse: GEM premier 3000 von Instrumentation Laboratory

Notfallmedikation:

Atropin 0,01 mg/kg/KG

Robinul 1 Amp. = 1 ml = 0,2 mg

Efedrin 1 Amp. = 1 ml = 50 mg (1:10 verdünnt 1 ml = 5 mg)

Neosynephrine 1 ml = 100 µg

Nachdem das Tier tief genug narkotisiert und an das Monitorig-, Beatmungs- und Narkoseerhaltungssystem angeschlossen wurde, wurde die Haare von der Setzfläche mit einem Haarschneider entfernt, wobei besonders darauf geachtet wurde, die Haut nicht zu verletzen. Als Setzort wurde die laterale Seite des Bauchs des Tieres ausgewählt, da dort die Haut des Schweines am ehesten mit menschlicher Haut zu vergleichen ist (vgl. 2.9.1). Nachdem die Haare entfernt wurden, wurde der Setzort mit Alkohol [Skinsept® pur Ecolab GmbH, Muttenz, Schweiz] getränkten Tupfer desinfiziert. Da durch die Enthaarung und tiefes Narkotisieren der Versuchstiere die Gefahr der Hypothermie besteht, waren die Schweine während der gesamten Dauer des jeweiligen Versuches mit einer Wärmedecke zugedeckt.

Sakrifizierung

Nach Beendigung des Versuches wurden die Tiere noch in Narkose durch einen Bolus Kaliumchlorid sakrifiziert. Sakrifizierung der Versuchstiere durch Gabe von:

Propofol 1%: 200mg i.v.

Nimbex 20mg i.v.

Kaliumchlorid 60mval i.v.

2.9.3. Versuchsdurchführung

Nach dem Narkotisieren und der Desinfektion der Setzfläche, werden die Katheter subkutan (auf einer Bauchseite) und dermal (auf der anderen Bauchseite) gesetzt. Bei der Versuchsreihe zur Untersuchung und dem Vergleich der Katheter wurden sowohl MD Katheter, als auch OFM Katheter verwendet. Im Speziellen wurden die State of the Art Mikrodialyse Katheter (dermal CMA 66 und subkutan CMA 60) mit "alten" OFM-Techniken ("Helix-Katheter" für dermale Anwendung und "18-G-Katheter" für subkutane Anwendung) und mit „neuer“ Methode des „Braid-Katheters“ (sowohl für dermale als auch für subkutane Anwendung) verglichen:

- Intradermal:
 - 3 CMA Katheter (State of the Art MD-Methode)
 - 3 "Helix-Katheter" ("alte" OFM-Methode)
 - 3 "Braid-Katheter" ("neue" OFM-Methode)
- Subkutan:
 - 3 CMA Katheter (State of the Art MD-Methode)
 - 3 "18-G-Katheter" ("alte" OFM-Methode)
 - 3 "Braid-Katheter" ("neue" OFM-Methode)

Damit die Katheter möglichst präzise implantiert werden, wurden die geplanten Ein- und Austrittsstellen, sowie in der Mitte, mit einem OP Hautmarkierungsstift markiert. Die genaue Anordnung der Katheter ist in der Abb. 33 zu sehen. Die Ein- und Austrittsstellen waren jeweils 3 cm voneinander entfernt. Drei Katheter derselben Type wurden jeweils im Abstand von je 2 cm nebeneinander implantiert (siehe Tabelle 4 und Appendix: Tabelle 7 bis Tabelle 12).

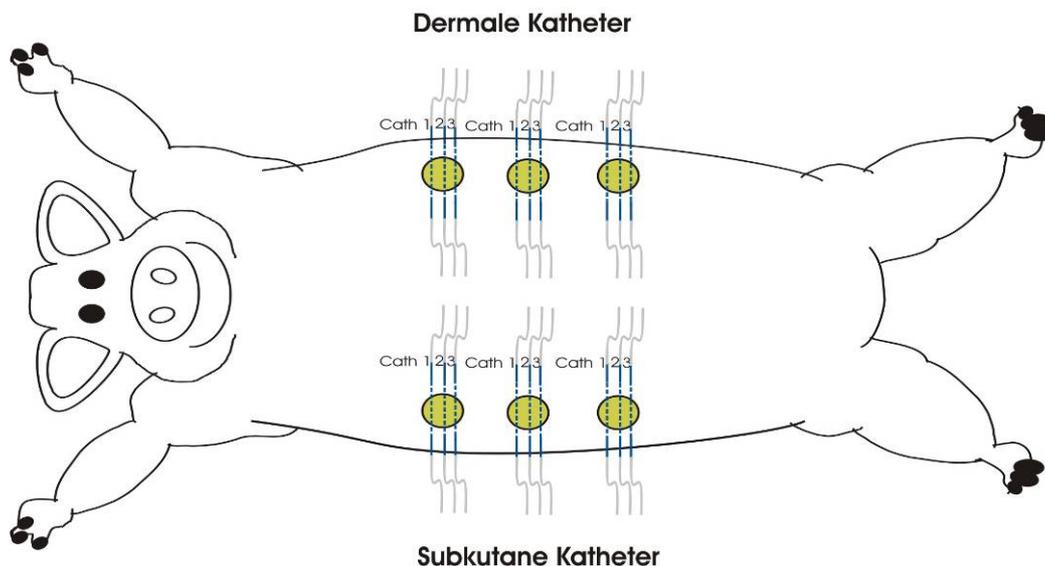


Abb. 33: Schematische Darstellung der Anordnung der verwendeten Katheter

Die Setzrichtung erfolgte entlang der Flussrichtung. Die linearen Helix und Braid Katheter sind mit einer geraden und steifen Implantationsnadel ausgestattet, welche in das Gewebe geschoben wurde (vgl. Abb. 34, Abb. 35). Die Setznadel ist länger als die Strecke, die im

Methoden

Gewebe zurückgelegt wird, sodass die Nadel vom Einstichpunkt bis Austrittspunkt geschoben und ab dann durch das Gewebe gezogen werden konnte (vgl. Abb. 35).



**Abb. 34: Implantation des Braid Katheters:
Einführen der Nadel**



Abb. 35: Durchziehen des Katheters

Der Braid Katheter wurde so eingeführt, bis die markierten Ringe (Marker Band) nahe den Stichstellen positioniert wurden. So wurde sichergestellt, dass sich die Austauschfläche des Katheters zur Gänze im Gewebe befindet. Danach wurde der Katheter nahe der Setznadel mit einer Schere bis zum Stützdraht angeschnitten, unter Beachtung, dass die Setznadel in Verbindung mit dem Draht bleibt, wodurch das Herausziehen des Drahtes erleichtert wurde. Nach der Implantation wurden alle Braid Katheter (dermal, subkutan) an den Ein- und Austrittsstellen mit einem Tropfen des Klebers (Cyanacrylat) mit der Haut verklebt, damit sie in ihrer Position bleiben (vgl. Abb. 36). Die Gefahr dass die Katheter verrutschen und die Austauschflächen bei der Ein- oder Austrittsöffnung herausrutschen, wird dadurch verhindert. Die Anordnung der gesetzten Braid Katheter auf der dermalen Seite ist in der Abb. 37 zu sehen.



**Abb. 36: Kleben der implantierten Braid
Kathetern**



Abb. 37: Die dermalen Braid Katheter

Die Implantation des subkutanen Braid Katheters erfolgte wie bei den dermalen Kathetern. Das Zielgewebe wurde durch die markierten Stellen mit der Setznadel durchgestochen (Abb. 38) und der Katheter durchgezogen (Abb. 39), bis die markierten Ringe nahe Ein- und Austrittsstellen platziert wurden (Abb. 40).

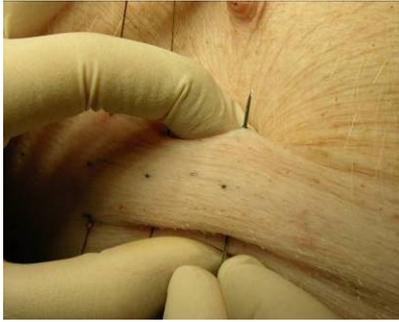


Abb. 38: Durchstechen der subkutanen Fettgewebe



Abb. 39: Durchziehen des Katheters durch die Kanüle

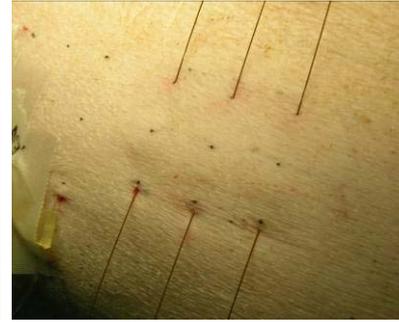


Abb. 40: Die subkutanen Braid Katheter

Der „Helix Katheter“ wurde bis zum ersten Distanzring eingeführt (vgl. Abb. 41) und vor dem Entfernen der Setznadel noch der zweite Distanzring aufgeschoben. Die Distanzringe wurden von beiden Seiten des Katheters bis zu den Stichstellen aufgeschoben, damit der Katheter nicht verrutschen konnte und zu sichern, dass die ganze Austauschfläche des Katheters im Gewebe bleibt (vgl. Abb. 42). Der Katheter wurde bei der Seite mit der Setznadel 2cm von der Austrittsstelle entfernt abgeschnitten.



Abb. 41: Einführen der Nadel in die Haut



Abb. 42: Die dermalen Helix Katheter

Der „CMA 66 Linear Microdialysis Catheter“ wurde mit Hilfe einer 21 Gauge (0,8mm) Kanüle intradermal gesetzt (Abb. 43). Der Katheter wurde durch die gesetzte Nadel so durchgezogen, dass sich die Austauschfläche zur Gänze im Gewebe befindet (Abb. 44). Anschließend wurde die Setznadel entfernt und der Katheter mit Seidenpflaster [3M Durapore, St. Paul, Minnesota] fixiert (Abb. 45).



Abb. 43: Einführen der Kanüle in die Haut



Abb. 44: Durchziehen des Katheters durch die Kanüle



Abb. 45: Die dermalen CMA 66 Katheter

Methoden

Die Implantation des „CMA 60 microdialysis“ Katheters gelang über eine Kanüle (1,4mm Introducer), in der sich der Katheter befindet. Die Kanüle wurde in das subkutane Gewebe eingesetzt (vgl. Abb. 46; Abb. 47) und der Katheter festgehalten (gelb), bis die Kanüle (weiß) entfernt wurde. Die implantierten Katheter wurden an der Haut mit Seidenpflaster befestigt, um ein mögliches Bewegen und Herausrutschen der Katheter zu vermeiden (vgl. Abb. 48).



Abb. 46: Einführen der Introducer Kanüle in das Fettgewebe

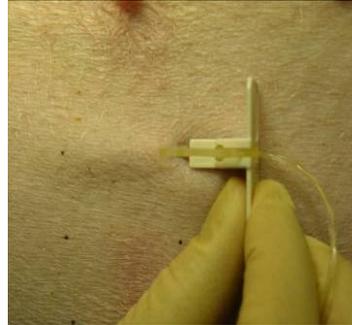


Abb. 47: Entfernen der Introducer Kanüle

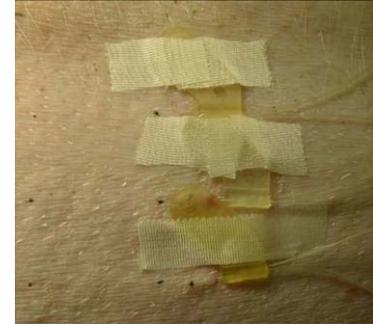


Abb. 48: Die fixierten subkutanen CMA 60 Katheter

Der konzentrische 18G Katheter ist von der Setznadel umhüllt, wobei die Spitze der Nadel frei ist. Die Implantation wurde so durchgeführt, dass nach dem Einstechen (vgl. Abb. 49) die Setznadel aus dem Katheteraußenteil herausgezogen wurde und der Katheteraußenteil im subkutanen Gewebe lag. In den Katheteraußenteil wurde anschließend der Innenteil eingeführt und mit dem Schlauchsystem verbunden (vgl. Abb. 50).



Abb. 49: Einführen des 18G Katheters in die Fettgewebe

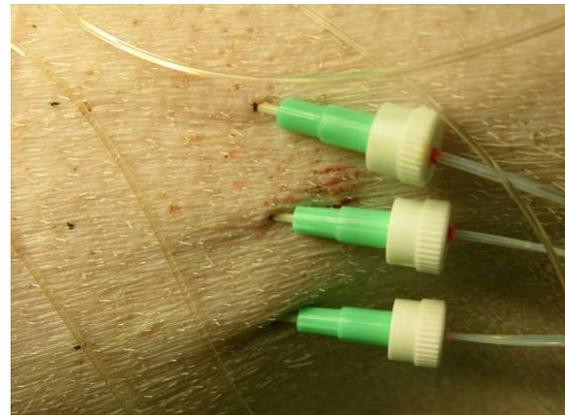


Abb. 50: Die subkutanen 18G Katheter

Methoden

Nachdem die Schläuche der Push Zweige mit Perfusat gefüllt waren, wurden sie an die Push Seite der implantierten Katheter angeschlossen. Es wurde gewartet bis das Rückperfusat am freien (Pull) Ende des Katheters zu sehen war und erst dann die Katheter an die Pull Schläuche angeschlossen. Anschließend wurden die Katheter mit einer kleinen Flussrate von $1\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert und sichergestellt, dass sich das gesamte System mit der Perfusionslösung gefüllt hat. Danach wurde 1 Stunde Einlaufzeit für das gesamte System benötigt, in der das betroffene Gewebe die Möglichkeit hatte sich vom Setztrauma zu erholen [17]. Am Enden des Pull Zweigs sind Edelstahlröhrchen so tief in die Schläuche eingeführt, dass die Verbindung mit den Probenvials dicht war. Da die gewonnenen Proben in der Größenordnung von $100\mu\text{l}$ sind, wurden die Sammelbehältnisse (Vials) mit Parafilm abgedeckt, um den Inhalt der Proben zu sichern und eine Verdampfung durch die Raumtemperatur zu vermeiden. Nach der Einlaufphase wurden die Röhrchen aus den Schläuchen durch den Parafilm in die Vials eingestochen und es wurde mit dem Versuchsprotokoll bzw. Sampling begonnen.

Als Perfusat wurde Mannit 5% verwendet. Auf der subkutanen Seite (Abb. 33) betrug die Flussgeschwindigkeit konstant $1\mu\text{l}/\text{min}$ während des Experimentes. Die Flussraten auf der dermalen Seite wurden während der Versuchreihe verändert, wie in Appendix genau beschrieben ist. Jeder Katheter wurde in einem eigenen Sammelbehältnis (Vial) gesammelt. Die Probenvials wurden in 120 Minuten Intervallen getauscht, mit der Flowraten von $1\mu\text{l}/\text{min}$ bis $4\mu\text{l}/\text{min}$ (Tabelle 4 bis Tabelle 7) und der Dauer von 120 Minuten ergab sich ein Probenvolumen von 120 bis $480\mu\text{l}/\text{min}$ pro Fraktion. Inulin wurde intravenös als „primed-continuous“ Infusion während des ganzen Experiments verabreicht (Abb. 51). Blutproben wurden im Intervall von 120 Minuten abgenommen, zugehörig zu den ISF Proben (vgl. Abb. 51), um Referenzwerte für Ionen, Inulin und Albumin gewinnen zu können. Die anschließende Sampling-Phase dauerte 8 Stunden, wie in der Abb. 51 dargestellt.

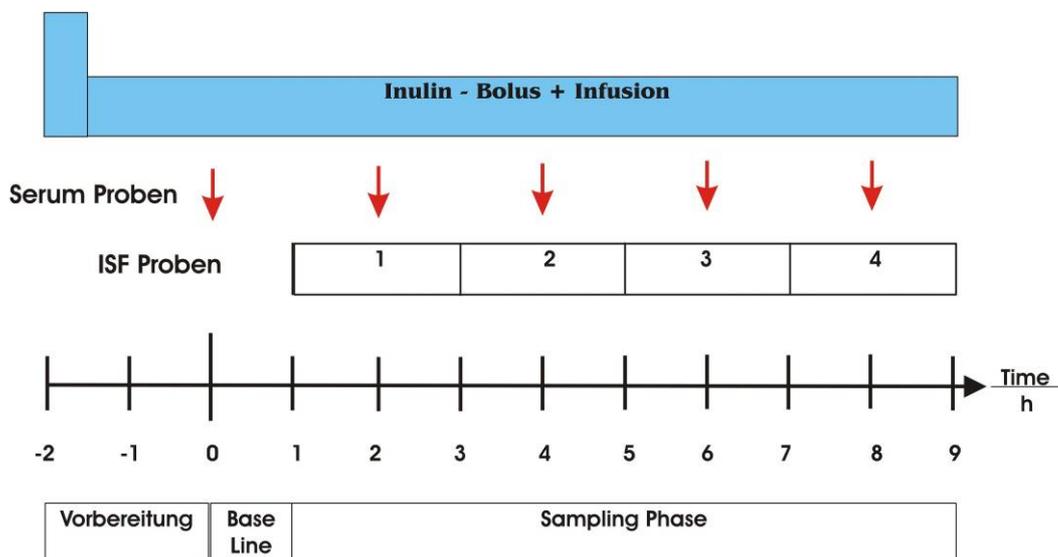


Abb. 51: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

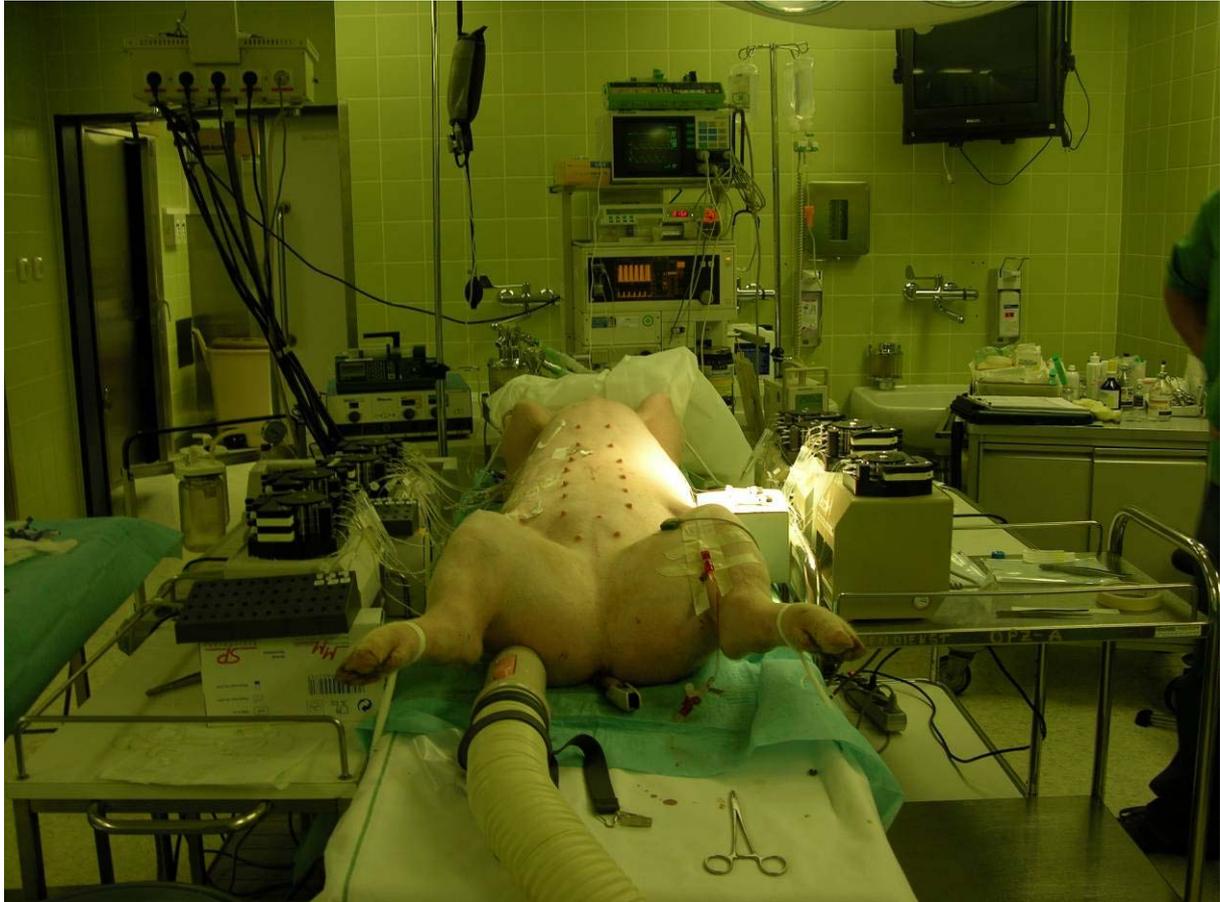


Abb. 52: Typischer Versuchsaufbau

Ein typischer Versuchsaufbau ist in der Abb. 52 zu sehen. Die Pumpen wurden in unmittelbarer Nähe der Katheter aufgestellt, um lange Zu- und Ableitungen zu vermeiden und so eine unzulässige Vermischung (Carryover) der Samples zu verhindern. Neben den Pumpen sind Kryogenboxen mit Probenvials aufgestellt. Im Hintergrund sind das Monitorig-, Beatmungs- und Narkoseerhaltungssystem zu erkennen.

Die Proben des gesammelten Rückperfusates (ISF + Perfusat) wurden anschließend gewogen und im Tiefkühlschrank der chirurgischen Forschung im OP bei -24°C zwischengelagert. Nach dem Versuch wurden alle Proben ins Labor gebracht und dort bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2.9.4. Materialien und Hilfsmittel

a) Hauptbestandteile der Fluidik:

- 8 Peristaltik Pumpen (Minipulse 3, Gilson, 4 Kanal)
- Tygon®Schlauch Sets für MD (ID 0.19mm, Push 80cm, Pull 80cm)
- Tygon®Schlauch Sets für OFM (ID 0.19mm, Push 80cm, Pull 80cm)
- Perfusat Reservoirs (14ml Falcon Tubes)
- Beschriftete und gewogene Maximum Recovery Vials (mit Parafilm verschlossen) zum Sammeln des Perfusates
- MD Katheter
- OFM Katheter
- Edelstahlröhrchen
- Perfusat (5% Mannitlösung)

b) Hilfsmittel für das Setzen und Kontaktieren der Katheter

- OP Hautmarkierungsstift
- Lineal
- Div. Nadelhalter
- Div. Pinzetten
- Schere
- 3M Durapore hypoallergenes Seidenpflaster
- Seitenschneider

c) Hilfsmittel für die Vorbereitung und Behandlung der Tiere beim Versuch

- Elektrischer Haarschneider
- Tupfer und div. Einmalartikel
- Alkohol zum Desinfizieren (Skinsept® pur Ecolab GmbH)
- Div. Spritzen und Kanülen
- NaCl- und Ringer- Lösung
- Wärmedecke mit dem Luftwärmer
- Geräte für Narkose und Monitoring
- Kleber Cyanacrylat

d) Hilfsmittel für das Sampling

- Kryogenboxen
- Feinwaage für gesammelte Proben
- Gefrierschrank
- Div. Spritzen und Kanülen
- Div. Schreibunterlagen und Etiketten
- Versuchsprotokoll und Formulare
- Stifte
- Stoppuhr

2.10. Auswertung und Analytik

Konzentrations- und Recoverydaten wurden zunächst ‚subjectweise‘ gemittelt und aus diesen Mittelwerten wiederum der arithmetische Mittelwert für die gesamte Gruppe errechnet. Die Streuung wurde in Form der Standardabweichung (SD) dargestellt. Die gesammelten Probenials, wie bereits in 2.9.3 erwähnt, wurden nach dem Versuch ins Labor gebracht und dort bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Auswertung der gesammelten Dialysat (MD) und Rückperfusat (OFM) erfolgt durch folgende Analytikmethoden (Tabelle 1):

	Analytikmethode	Messgerät
Natrium, Kalium (mmol/l)	flammenphotometrische Bestimmung	Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA02421-3125, USA
Inulin (mg/l)	adaptierte Glucose/Hexokinase Methode	Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim
Albumin (g/dl)	Albumin BCG-Methode	Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

Tabelle 1: Analytikmethoden zur Auswertung der Moleküle verschiedener Molekulargewichten.

Die verwendeten Analytikmethoden mit den verwendeten Messgeräten (Tabelle 1) wurden vom Labor des Institutes für Medizinische Systemtechnik und Gesundheitsmanagement nach den Guidelines der FDA [18] validiert. Dadurch wurden die Präzisionen für die jeweiligen Analyten (Tabelle 3) bestimmt. LLoQ steht für „Lower Limit of Quantification“ und bezeichnet die unterste Nachweisgrenze (Quantifizierungsgrenze) der Analytikmethode. Die Genauigkeit der Werte, die unter dem LLoQ liegen, wird von der Analytikmethode nicht garantiert. Im Gegensatz dazu steht ULoQ für „Upper Limit of Quantification“ und stellt die oberste Quantifizierungsgrenze, bzw. den maximal nachweisbaren Wert der Analyten dar. Wie in 3.5 und 4.5 genauer beschrieben wird, wurden die Schläuche bzw. die Katheter bei einer Verstopfung gereinigt und gespült, um die eingestellte Flussrate wieder herzustellen. Falls bei einem Samplingintervall (Abb. 51) das Samplingsystem manipuliert wurde, wurde der erhaltene Wert ausgeschlossen und geht somit nicht in die Berechnung ein. Für verwendeten Analyten bei der Schweineversuchsreihe wurden in der Tabelle 2 folgende obere und untere Quantifizierungsgrenzen von der Analytik vorgegeben:

	LLoQ	ULoQ
Natrium (mmol/l)	13	200
Inulin (mg/l)	25	600
Albumin (g/dl)	0,08	1

Tabelle 2: Untere und obere Quantifizierungsgrenze der ausgewählten Analyten

	Präzision
Natrium	≤1,5%
Inulin	≤5,3%
Albumin	≤8%

Tabelle 3: Präzision der Analytikmethode mit verwendetem Messgerät

3. Ergebnisse

3.1. Assemblierung des „Braid Katheter“



Abb. 53: Katheter geklebt an die Unimed Nadel



Abb. 54: Katheter geklebt an die gecrimpte Kanüle und Stützdraht

Das Ergebnis der beiden Assemblierungsmethoden ist an diesen mikroskopischen Aufnahmen genau zu sehen. Bei der gecrimpten Kanüle kommt es zu einer Ausbreitung der Nadelfläche (Abb. 54). Der Durchmesser der Nadel (0,5mm) und des Katheters (0,32mm) bleibt bei der geklebten Unimed Nadel (Abb. 53) entlang der gesamten Fläche und besonders an der Übergangsstelle Katheter-Nadel unverändert.

3.2. Zugversuche

Es wurden 50 Braid Katheter getestet. 49 von 50 Kathetern entsprechen der Mindestanforderung der Reißkraft über 5 N (Abb. 55).

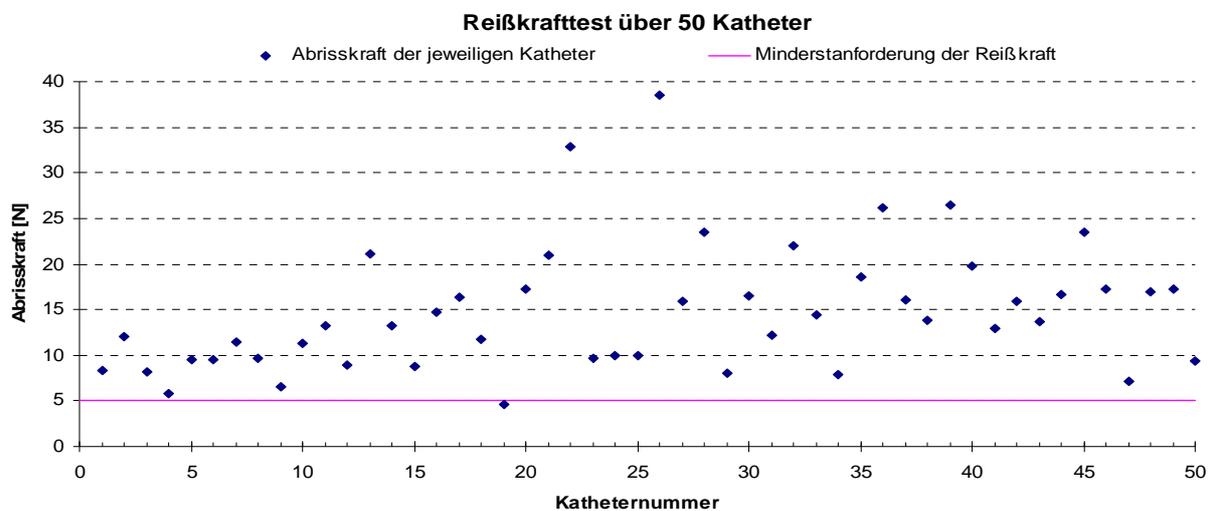


Abb. 55: Abrisskräfte der 50 getesteten Katheter

3.3. In vitro Flussratenbestimmung

Die Pumpe wurde zuerst beliebig eingestellt, um die Einstellung für die entsprechende Flussrate nach dem Abwiegen der gesammelten Proben zu berechnen. z.B. für die Schläuche mit ID 0,25mm wurde die Pumpeneinstellung folgendermaßen berechnet:

Die Pumpe wurde zuerst mit 0,27 Umdrehungen/min eingestellt, was einen Flow von 87,4µl/h (1,45µl/min) ergab (8):

$$\text{Flussrate (Flow)} = \frac{\text{Probenvolumen}}{\text{Samplingzeit}} \quad (8)$$

$$\text{Flussrate (Flow)} = \frac{87,4\mu\text{l}}{1\text{h}} = 87,4\mu\text{l/h} = 1,45\mu\text{l/min}$$

Die Flussrate, die Samplingzeit und die Umdrehungen/min sind bekannt. Daraus wird die Pumpeneinstellung für den gefragten Flow (meist 1µl/min) mittels einer Schlussrechnung (Dreisatz) berechnet:

Pumpeneinstellung (Umdrehungen/min)	Flussrate (µl/min)	Daraus ergibt sich die gesuchte Pumpeneinstellung:
0,27	1,45	$X = \frac{0,27 \cdot 1}{1,45} = 0,19 \text{ Umdrehungen/min}$
X	1	

In der Abb. 56 ist wegen der hohen Anzahl der Umdrehungen/min die erhöhte Flussrate nach der ersten Probe (bzw. Stunde) deutlich sichtbar. Ab der dritten Probe (ab 150 min) beträgt die Flussrate des Schlauchs ofm1 genau 1µl/min, die Flussrate des Ofm 2 ist etwas oberhalb des gewünschten Werts. Bis zum Versuchende sind die Flussraten der beiden Schläuche (ofm1 und ofm2) annähernd bei 1µl/min konstant geblieben. Als berechnete Pumpeneinstellung für die *Gilson Minipuls 3* [Gilson Inc., Meddleton, USA] Peristaltikpumpe für eine Flussrate von 1µl/min ergab sich 0,19 Umdrehungen/min für Polypropylen ID 0,25mm und 0,25 Umdrehungen/min für Tygon ID 0,19mm Schläuche für die verwendeten Schlauch-Chargen.

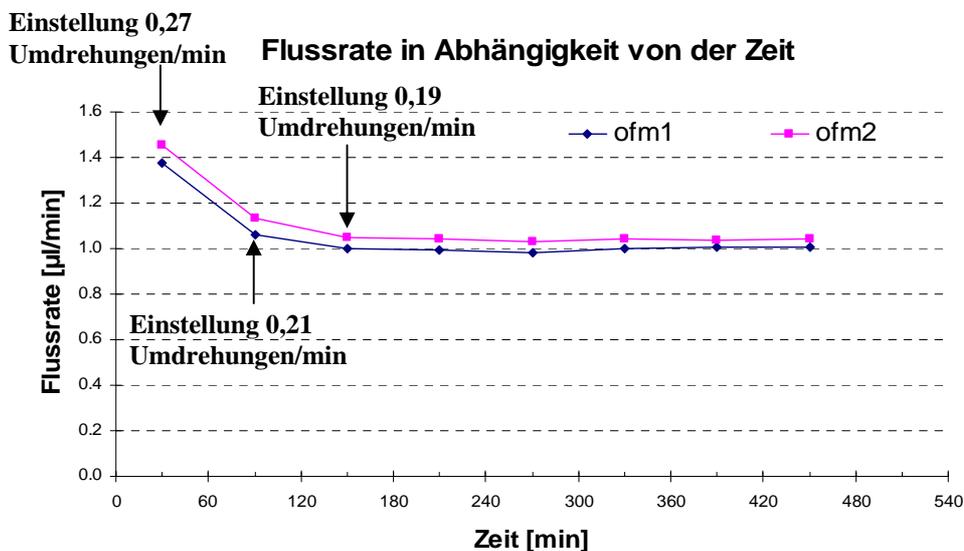


Abb. 56: Zeitlicher Verlauf der Flussrate für ID 0,25mm Schläuche

3.4. In vivo Flussratenbestimmung - Rattenversuche

Die ersten drei Rattenversuche (S1 bis S3) wurden als Pilotversuche durchgeführt, um den Setzvorgang, Durchführung der Narkose und das gesamte Samplingsystem zu optimieren. Die restlichen 8 Ratten (S4 bis S11) wurden für die Evaluierung der Performance des Braid Katheters durchgeführt. Es wurden der Vorgang der Implantation des Katheters und die Stabilität der Flussrate genauer untersucht.

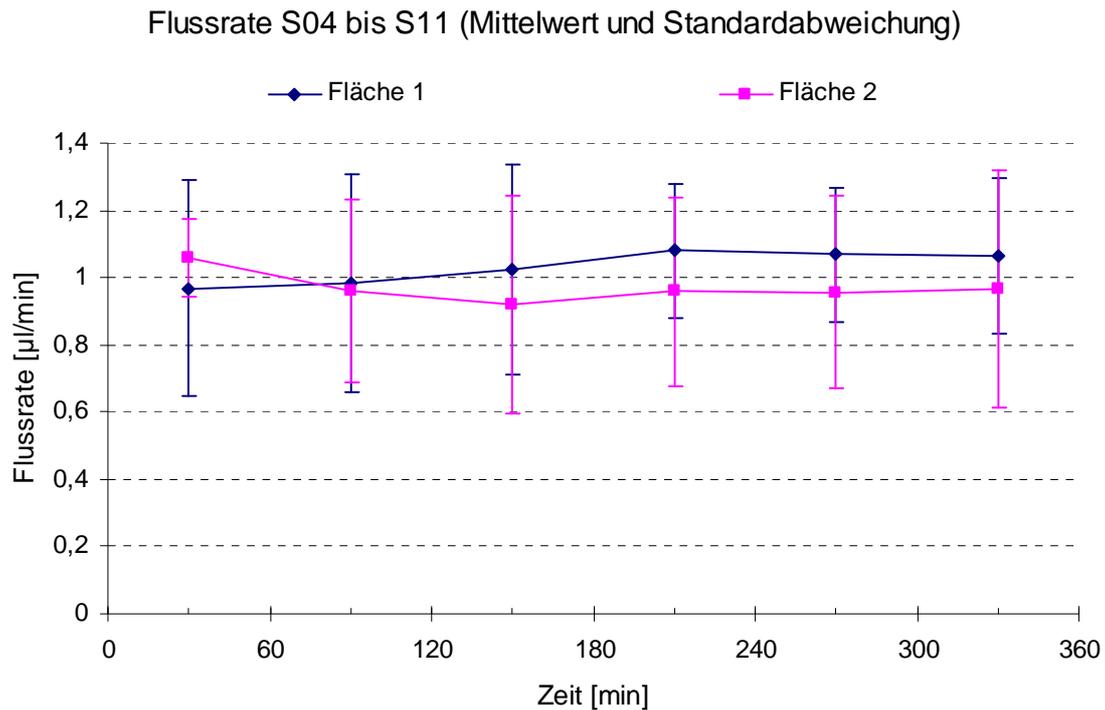


Abb. 57: Mittelwert und Standardabweichung der beiden Kathetergruppen

In der Abb. 57 sind die Mittelwerte der Flussraten über acht (S4-S11). Versuche mit dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Jeweils in 2 Flächen wurden 3 Braid Katheter in einem Abstand von 5mm nebeneinander eingesetzt (Abb. 27).

Nach der Entnahme der ersten Probe sinkt die mittlere Flussrate der Kathetergruppe 2 unter $1 \mu\text{l}/\text{min}$ im Gegensatz zur mittleren Flussrate der Kathetergruppe 1, die über den $1 \mu\text{l}/\text{min}$ Wert steigt. Zum Zeitpunkt 90 min sind die Mittelwerte der Flussraten der beiden Gruppen annähernd gleich, die in weiterer Folge bei $1 \mu\text{l}/\text{min} \pm 0,1 \mu\text{l}/\text{min}$ bleiben. Ab 210 min ist die mittlere Flussrate der Kathetergruppe 1 über $1 \mu\text{l}/\text{min}$ und annähernd konstant bis zum Schluss. Die mittlere Flussrate der Kathetergruppe 2 befindet sich unter $1 \mu\text{l}/\text{min}$ (Zeitpunkt 150 min) mit einer Annäherung zum $1 \mu\text{l}/\text{min}$ Wert (Zeitpunkt 330 min).

3.5. Setzversuche - In Vivo Schweineversuche (S1-S6)

3.5.1. Der erste Versuch (S01)

Bei dem ersten Versuch (S01) handelte es sich um einen Pilotversuch, um die Setzbarkeit der Braid Katheter in der Schweinehaut über eine Distanz von 3cm mit den Kanülen (AD 0,5mm) zu überprüfen und anzupassen. Es wurden in die Dermis der Haut 3 Braid Katheter, 3 Helix Katheter und 3 CMA66 Mikrodialyse (MD) Katheter gesetzt und in die Subkutis 3 18 G Katheter, 3 Braid Katheter und 3 CMA 60 MD Katheter gesetzt (Tabelle 7). Wie die Abb. 58 zeigt, konnte die Kanüle mit Außendurchmesser von 0,5mm nur ca. 15mm in die Haut gesetzt werden (geplant waren 30cm Länge). Danach wurde die Reibung der Kanüle in der Haut so groß, dass eine größere Kraft aufgewendet werden musste, was wiederum zu einer Verbiegung der Kanüle geführt hat (vgl. Abb. 59). Die Kanüle konnte daher auch nicht mehr in einer gewünschten Tiefe positioniert werden. Deshalb wurde eine andere Implantationsmethode untersucht. Es wurde von einer Seite eine 21G Kanüle (AD 0,8mm) durch die Haut gestochen und von der anderen Seite der Katheter eingeführt.



Abb. 58: Setzen mit einer Kanüle Ø0,5mm. Distanz zwischen zwei Punkten ca. 15mm.



Abb. 59: Verbiegen der Kanüle durch das Setzen

Beim S01 Versuch ergaben sich relativ instabile und nicht konstante Flussraten der dermalen OFM Braid und Helix Katheter. Die Flussrate der subkutanen Braid und Helix Katheter waren stabiler im Vergleich zu dermalen Seite. Die Ergebnisse des Pilotversuches (S01) zeigten:

- Setzbarkeit der OFM Katheter in der Schweinehaut mit einer Kanüle AD 0,5mm über 30mm ist nicht möglich (Abb. 59).
- Vorstechen mit einer Kanüle mit AD 0,8mm verursacht ein großes Setztrauma.
- Die Systeme (Katheter und Pumpschlauch) auf der dermalen Seite „verstopften“ innerhalb von 4 Stunden und schneller als die subkutanen Systeme.

Die Ergebnisse des ersten Pilotversuches zeigten auf der dermalen Seite, dass auf die Setzprozedur, wie auch auf den Betrieb der Braid Katheter ein besonderes Augenmerk gelegt werden muss. Daher wurden in den folgenden Versuchen auf den Vergleich zwischen Braid und alter OFM bzw. auch mit der MD „vorerst“ verzichtet. Es wurden in die Dermis 9 Braid Katheter gesetzt (vgl. Appendix Tabelle 8 bis Tabelle 12) und folgende Lösungswege untersucht:

- Stabile Flussrate, beseitigen der Verstopfungen durch:
 - Erhöhung der Flussrate
 - Erhöhung des Pumpschlauchinnendurchmessers
 - Änderung des Pumpschlauchmaterials
 - Änderung des Samplingsetups
- Verringerung des Setztraumas durch:
 - Verbesserung der Setzmethode
 - Änderung des Körpergewichtes des Versuchsobjektes

3.5.2. Der zweite Versuch (S02)

Beim nächsten Versuchsobjekt (S02) wurden die oben genannten Lösungswege untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Braid Kathetersysteme mit Flussraten von 1, 2 und 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert (Tabelle 8). Die Braid Kathetersysteme ofm4, ofm5 und ofm6 auf der dermalen Seite wurden mit Polypropylen Schläuchen größeren Innendurchmessers statt mit Tygon Schläuchen betrieben. Bei diesem Versuch haben sich an den Stellen zwischen Katheterausfluss und Schlauch Blut-Koagulationen gebildet (Abb. 60; Abb. 61). Diese Koagulationen verursachten eine Anlagerung des Blutes in den Absaugschläuchen. Durch die Länge des Saugschlauches von 80cm und die geringen Fließgeschwindigkeiten konnten sich Zellen leicht an die Innenwand anlagern und damit das Absaugsystem verstopfen (Abb. 62). Durch Anlagerungen im Schlauch ergab sich beim kontinuierlichen Betrieb des Samplingsystems ein Unterdruck, der sich durch das Bilden der Luftblasen in Absaugschläuchen manifestiert hat (Abb. 63). Die Erhöhung der Flussrate auf 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ bewirkt weniger Koagulationen beim Sammeln der Proben. Die Verwendung von Polypropylenschläuchen zeigte keinen positiven Effekt auf das Sampling.



Abb. 60: Entstehung der Koagulationen am Katheterausgang

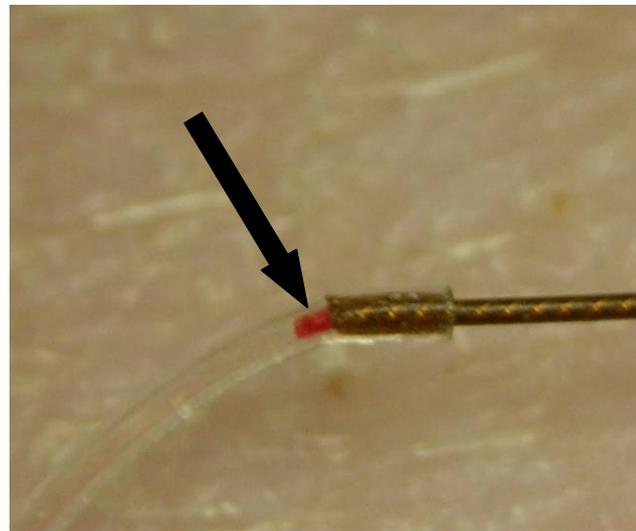


Abb. 61: Blutkoagulation im Übergang Katheterausfluss - Saugschlauch

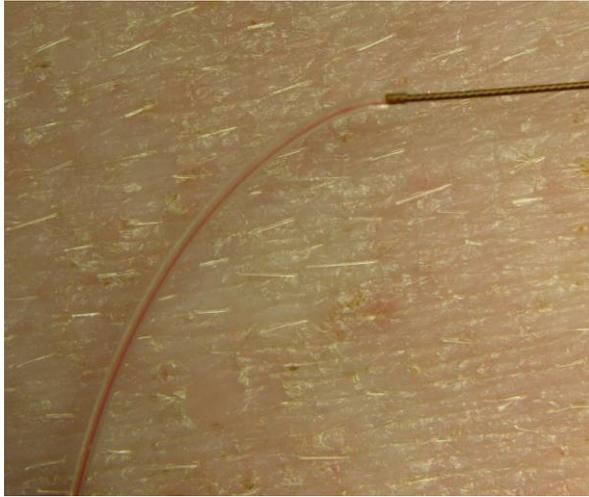


Abb. 62: Blutanlagerung am Saugschlauch



Abb. 63: Blutkoagulation im Katheterausfluss - Saugschlauch und Luftblasen im Schlauch

3.5.3. Der dritte Versuch (S03)

Die Katheter wurden beim dritten Versuch (S03) nach dem Setzen nicht mehr an der Abfluss- sondern an der Zuflussseite abgeschnitten und dann an das Samplingsystem angeschlossen. Neben dem Push Pull System wurden noch zwei zusätzliche Samplingsysteme angewandt, um die Koagulationen zu vermeiden (Tabelle 9). Beim Unterdruck Sampling wird eine Blutkapillare einerseits mit dem Katheter, andererseits an die Saug-Pumpe verbunden, die einen Unterdruck erzeugt und das Sampling System zum Laufen bringt. Beim passiven Outflow wird ein Probenvial direkt mit dem Katheterausfluss in Verbindung gebracht, ohne den Saug (Pull) Schlauch an die Saug-Pumpe zu legen. Die Katheter ofm4-ofm6 wurden mit dem Unterdruck- und ofm7-ofm9 mit einem passiven Outflow-System perfundiert (Tabelle 9).

Ergebnisse des dritten Versuches (S03) zeigten:

- Das Sampling mit dem passiven Outflow funktionierte nicht, das Sampling der ofm8 und ofm9 Katheter musste abgebrochen werden.
- Das Unterdruck Sampling System bewirkte keine zufriedenstellende Verbesserung
- Die Flussraten der dermalen Braid Katheter von 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ konnten nicht konstant gehalten werden und sanken mit der Zeit bis 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- Die Flussraten der subkutanen OFM Katheter sind in den ersten 4 Stunden konstant (1 $\mu\text{l}/\text{min}$), danach sanken die Flussraten bis zu 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- Die subkutanen Mikrodialyse (MD) Katheter funktionierten mit einen hohen Flow von 1,2 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit einer Steigerung auf 1,4 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- Auf der subkutanen Seite traten die Probleme des Verstopfens wieder nach ca. 4h auf. Nach diesen 4h kommt es vermehrt zu Verstopfungen und Verminderung der Flussgeschwindigkeit.
- Das Abschneiden des Katheters an der Zuflussseite hat zu keiner Verminderung des Verstopfens geführt.

3.5.4. Der vierte Versuch (S04)

Das Hauptaugenmerk beim 4. Versuch war das Setztrauma zu verringern, einen kontinuierlichen Betrieb und eine stabile Flussrate der einzelnen Katheter zu erzielen. Dazu wurden alle dermalen Braid Katheter mit einer dünneren 0,5mm AD Setznadel über 30mm Länge implantiert. Die Setztiefe der dermalen Braid Katheter konnte aufgrund der großen Reibungskraft der Nadel mit der Haut nicht über die gesamte Setzlänge konstant gehalten werden, aber im Vergleich zum Vorstechen mit einer Außendurchmesser (AD) 0,8mm Kanüle ergaben sich hier deutliche Verbesserungen, wie in der Abb. 64 und Abb. 65 gezeigt.



Abb. 64: Setzen mit Nadel Ø 0,5mm



Abb. 65: Setzen mit Kanüle Ø 0,8mm

Alle dermalen Braid Katheter wurden mit einer Flussrate von 4µl/min und mit Polypropylen ID 0,25 Schläuchen perfundiert (Appendix: Tabelle 10). Der Versuch beim S04 wurde an einem ca. 40kg schweren Schwein durchgeführt, im Gegensatz zu früheren Subjects, die ca. 60kg gewogen haben. Nach dem Setzen der Katheter auf der dermalen sowie auf der subkutanen Seite, wurde mehr als 1,5h vor dem Sampling-Start mit dem Kontaktieren des Pull-Schlauches gewartet und das System durchgespült. Die Flussraten der OFM Katheter beim S04 Versuch haben sich folgendermaßen verhalten:

- Dermale Seite (Ofm1-Ofm3):

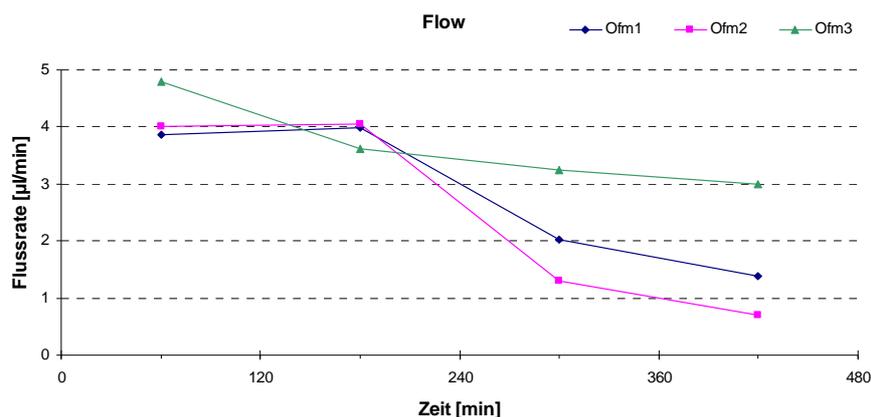


Abb. 66: Flussraten der Ofm1-Ofm3 Katheter beim S04 Versuch

Das Kontaktieren der Katheter mit dem Push- und Pull-Schlauch nach einer Wartezeit von 1,5h brachte keine merkliche Verbesserung der Flowrate (Abb. 66). Die Wartezeit sollte dazu dienen, dem Gewebe Zeit zu geben sich vom Setztrauma zu erholen. Die Katheter wurden daher auch nicht mit dem Pull-Schlauch kontaktiert, um im Gewebe kein Flüssigkeitsödem zu bilden. Hier war wieder erkennbar, dass nach einer Zeit von 4-6 Stunden die Flowraten der Katheter sinken.

- Dermale Seite (Ofm4-Ofm6):

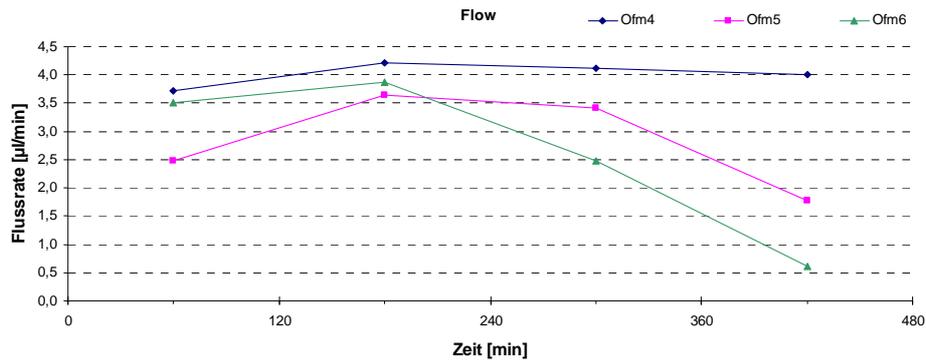


Abb. 67: Flussraten der Ofm4-Ofm6 Katheter beim S04 Versuch

Die Flowraten der Katheter Ofm4-Ofm6 (Abb. 67) waren zu Beginn des Versuches unter $4\mu\text{l}/\text{min}$ und sind danach auf den gewünschten Wert gestiegen. Im letzten Sample sanken die Flussraten des Ofm5 unter $2\mu\text{l}/\text{min}$ und Ofm6 unter $1\mu\text{l}/\text{min}$.

- Dermale Seite (Ofm7-Ofm9):

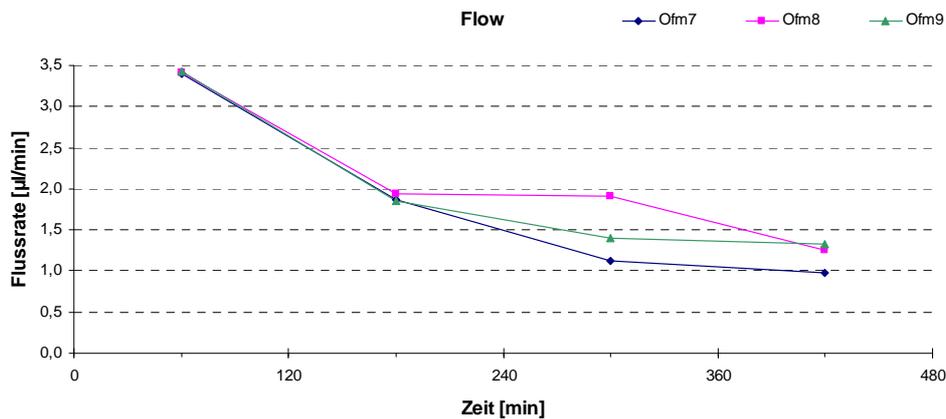


Abb. 68: Flussraten der Ofm7-Ofm9 Katheter beim S04 Versuch

Diese Katheter (Abb. 68) wurden schon mit kontaktiertem Push-Schlauch gesetzt und nach dem Setzen gleich kontaktiert. Die Flowrate wurde im ersten Samplingintervall auf einen Flow von $3,5\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt (ca. $2,8\mu\text{l}/\text{min}$ laut in vitro Versuch) und nach dem ersten Abwiegen auf eine Flowrate von $2\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt. Die Flowrate der Ofm8 blieb im nächsten Samplingintervall (Zeitpunkt 180min) bei $2\mu\text{l}/\text{min}$, während Ofm 7 und Ofm9 unter $1,5\mu\text{l}/\text{min}$ sanken. Zum Zeitpunkt 420min (letztes Sample) sind die Flussraten aller drei OFM Katheter unter $1,5\mu\text{l}/\text{min}$ gesunken.

- Subkutane Seite (Ofm10-Ofm12):

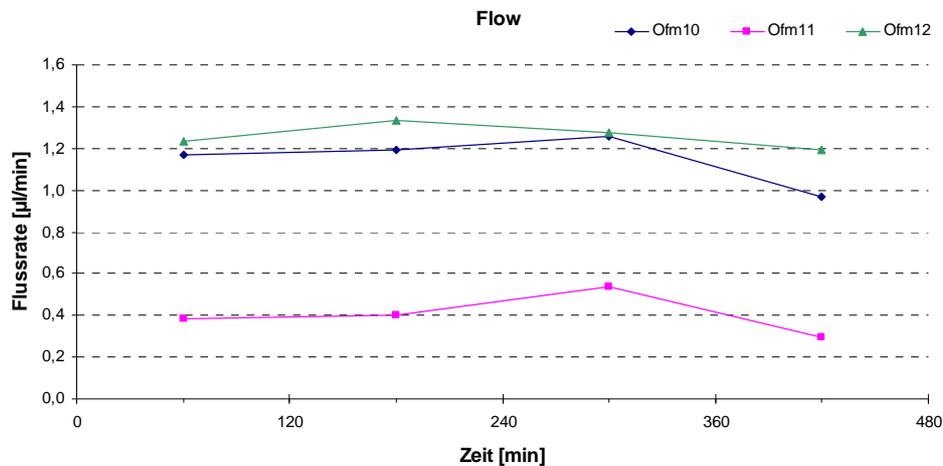


Abb. 69: Flussraten der Ofm10-Ofm12 Katheter beim S04 Versuch

Zwei der drei Katheter (Abb. 69) liefen annähernd bei 1,2 µl/min. Ofm 11 Katheter war von Anfang bis zum Ende hin auf eine Flowrate von 0,4µl/min beschränkt.

- Subkutane Seite (Ofm13-Ofm15):

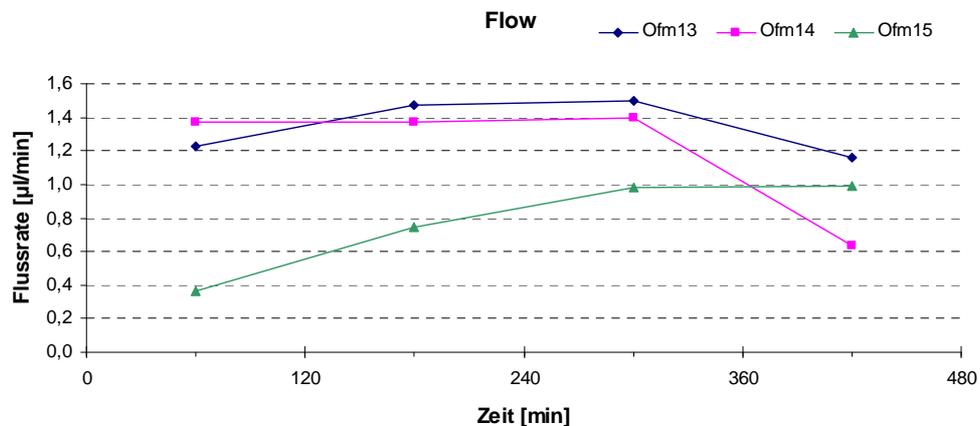


Abb. 70: Flussraten der Ofm13-Ofm15 Katheter beim S04 Versuch

Katheter Ofm15 war von Anfang an blutig und es musste nach ca. 1 Stunde das Innenteil gewechselt werden. Danach stieg die Flowrate (Abb. 70) erst nach 300 min. auf 1µl/min an. Die Flussraten der anderen 2 Katheter waren bis zum Zeitpunkt 300 min annähernd bei 1,4µl/min. Deren Flussrate ist im letzten Samplingintervall unter 1,4µl/min gesunken.

- Subkutane Seite (Md1-Md3):

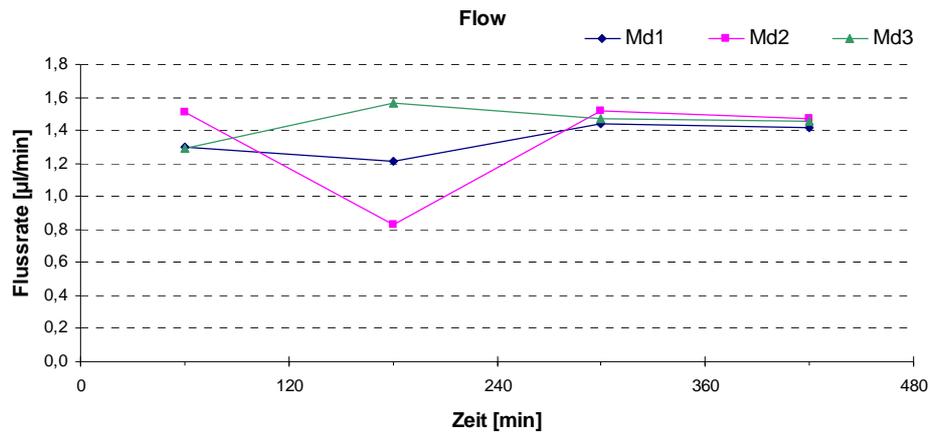


Abb. 71: Flussraten der Md1-Md3 Katheter beim S04 Versuch

Die Katheter stellten sich erst in den letzten beiden Samplingintervallen auf einen Flow von 1,4 µl/min ein (Abb. 71).

Die Ergebnisse des vierten Versuches (S04) zeigten:

- Setzen mit dem Nadeldurchmesser von 0,5mm führt zu geringerem Setztrauma.
- Einblutungen in die Katheter-Austauschflächen können minimiert werden.
- Kontaktieren der Katheter mit dem Pull-Schlauch erst nach einer Stunde führt zu keiner merklichen Verbesserung.
- Verstopfungen treten noch immer nach 4-6 Stunden auf, vor allem im Katheterausfluss.
- Das Setzen der Nadeln im Schwein mit geringerem Gewicht (Ca. 40kg anstatt >50kg) führt zu leichterem Setzen. Die Katheter können daher oberflächlicher gesetzt werden.

3.5.5. Der fünfte Versuch (S05)

Das Setztrauma ist zwar geringer, es treten aber immer noch Verstopfungen in den Katheterausfluss und führen zur Verstopfung der Schläuche und damit des Gesamtsystems. Hauptaugenmerk des S05 Versuches war die Reduktion bzw. das Verhindern der Verstopfungen durch Erhöhung der Flussrate von 1µl/min auf 4µl/min (Tabelle 11) und Verkürzung des Katheterausflusses von 4cm auf 2cm. Die Ausflusslänge wurde verringert, um die Verweilzeit der Probe im Katheterschlauch zu verkürzen und damit die Adsorptionen zu vermindern. Während des Setzens der Katheter wurde die Hautoberfläche mit Alkohol gedrängten Tupfer zwischendurch abgedeckt. Bei diesem Versuch wurde ein Schwein mit geringerem Gewicht (ca. 40kg im Gegensatz zu ca. 60kg) verwendet.

Die Ergebnisse des fünften Versuches (S05) zeigten:

- Männliche Schweinehaut vom Schwein mit einem Gewicht von ca. 40kg führt zu leichterem Setzen. Die Katheter konnten auch oberflächlicher gesetzt werden.
- Abdecken mit Alkohol getränkten Tupfern führt zu leichterem Setzen. Die Haut ist weicher und geschmeidiger, der Katheter kann oberflächlicher gesetzt werden. Der Katheter kann auch leichter in die Haut eingezogen werden.

- Setztrauma wird geringer beim Setzen mit einer AD 0,5mm Nadel, an einem ca. 40kg schweren Schwein
- Es wurden stabilere Flussraten auf der dermalen Seite erreicht.
- Verkürzen des dermalen Braid Katheters auf 2 cm von der Ausstichstelle resultiert mit weniger Koagulationen im Katheterausfluss.

3.5.6. Der sechste Versuch (S06)

Da der Setzvorgang in die Dermis der Haut bei leichteren Schweinen (ca. 40kg) mit weniger Kraft und Aufwand erfolgt, wurde beim sechsten Versuch (S06) versucht, den Katheter oberflächlicher zu setzen und den Setzvorgang so zu optimieren, dass die Austauschfläche des Katheters durchgehend gleich tief gesetzt ist. Da S04 und S05 ca. 40kg schwere männliche Schweine waren, wurde der sechste Versuch an einem ca. 40 kg schweren weiblichen Schwein durchgeführt, mit dem Ziel, den Setzvorgang an einer männlichen und weiblichen Schweinehaut zu vergleichen. Die Flussrate wurde wieder auf eine geringe Flussrate von 1µl/min verringert. Die Ergebnisse des sechsten Versuches (S06) zeigten:

- Betrieb der Katheter mit der Flowrate von 1µl/min intradermal führt zu vermehrten Verstopfungen in den Katheter bzw. Schläuchen.
- Kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Schweinehaut hinsichtlich des Kathetersetzens.

3.6. In vivo Schweineversuche - Nachweis der klein-, mittel-, und großmolekularen Substanzen mittels Wiederfindungsrate (Recovery)

Bei den ersten sechs (S1-S6) Versuchen wurden das Versuchssetup und die Versuchsdurchführung der Schweineversuchsreihe optimiert, die Hindernisse beseitigt und ein Samplingsystem (Tabelle 4) für eine kontinuierliche Probengewinnung entwickelt. Daher wurden die S7 und S8 Versuche mit dem Ziel der Probensammlung und deren Auswertung durchgeführt. Ein Qualitätskriterium für ein OFM Katheter neben der geringen Invasivität ist eine möglichst hohe und stabile Wiederfindungsrate (Recovery). Aus dem Rückperfusat der OFM Katheter bzw. Dialysat der MD Katheter wurden klein bis großmolekulare Substanzen gemessen und die Wiederfindung untereinander verglichen. Wie bereits in 2.8.1 erwähnt wurden Natrium als kleinmolekulare, Inulin als mittelmolekulare und Albumin als großmolekulare Substanz verwendet und deren Recovery aus den gewonnenen Probenials ausgewertet. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse in diesem Kapitel sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gewonnenen Daten über zwei (S7 und S8) Versuche (vgl. 2.10). Die Anzahl der Katheter und die eingestellten Flussraten sind in der Tabelle 4: Prüfprotokoll für S07 und S08 Versuch zu sehen.

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Helix	Push-Pull	2µl/min	Tygon ID0,19
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Push-Pull	2µl/min	Tygon ID0,19
Dermal	Md1-Md3	CMA 66	Push-Pull	2µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm10-Ofm12	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm13-Ofm15	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md4-Md6	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 4: Prüfprotokoll für S07 und S08 Versuch

3.6.1. Vergleich der Katheter: Dermales Sampling

a) Nachweis der kleinmolekularen Substanz: Natrium (Na)

Die Abb. 72 zeigt die Mittelwerte der gesammelten Na Konzentrationen über zwei Versuche (S7 und S8) mittels den dermalen OFM (Braid, Helix) und MD Katheter (CMA 66) mit dazugehörigen Standardabweichungen. Der gemessene Na Wert durch den Braid Katheter beträgt maximal 75mmol/l und minimal 53,5mmol/l mit einer Standardabweichung (SD) von $\pm 9,6$ mmol/l. Die gesammelte Na Konzentration durch den Helix Katheter steht maximal bei 53,7mmol/l und minimal bei 33,1mmol/l mit einer Standardabweichung (SD) von $\pm 13,6$ mmol/l, was im Durchschnitt ca. 20mmol/l weniger als beim Braid Katheter beträgt. Die erhaltene Na Konzentration durch den CMA 66 Katheter hat ein Maximum bei 64 mmol/l, ein Minimum bei 45,5mmol/l mit einer SD von $\pm 11,4$ mmol/l. Die Abb. 73 stellt die Na Wiederfindungsraten des Braids gegenüber den Helix und CMA 66 Katheter, dargestellt in Prozent. Ähnlich dem Konzentrationsverlauf ist die Wiederfindungsrate des Natriums ist um ca. 20% höher bei der ‚neuen‘ (Braid) als bei der ‚alten‘ (Helix) OFM Technik. Die

Ergebnisse

Wiederfindungsrate beim CMA 66 Katheter ist im Schnitt um ca. 8% niedriger als beim Braid Katheter und beträgt maximal $38,9\% \pm 6,1\%$.

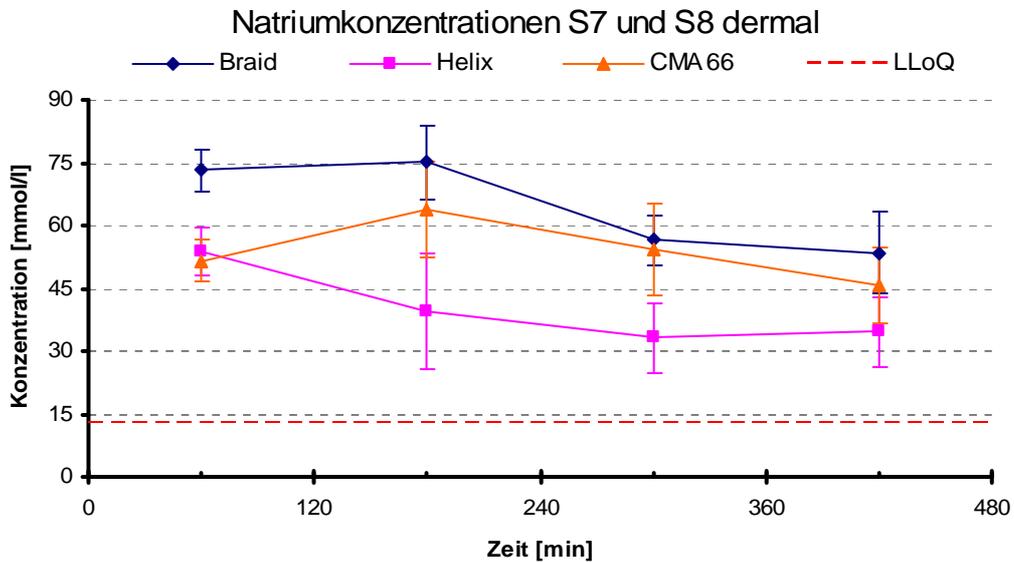


Abb. 72: Vergleich der Natriumkonzentrationen (S7, S8) der Braid, Helix und CMA 66 Katheter - dermale Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze

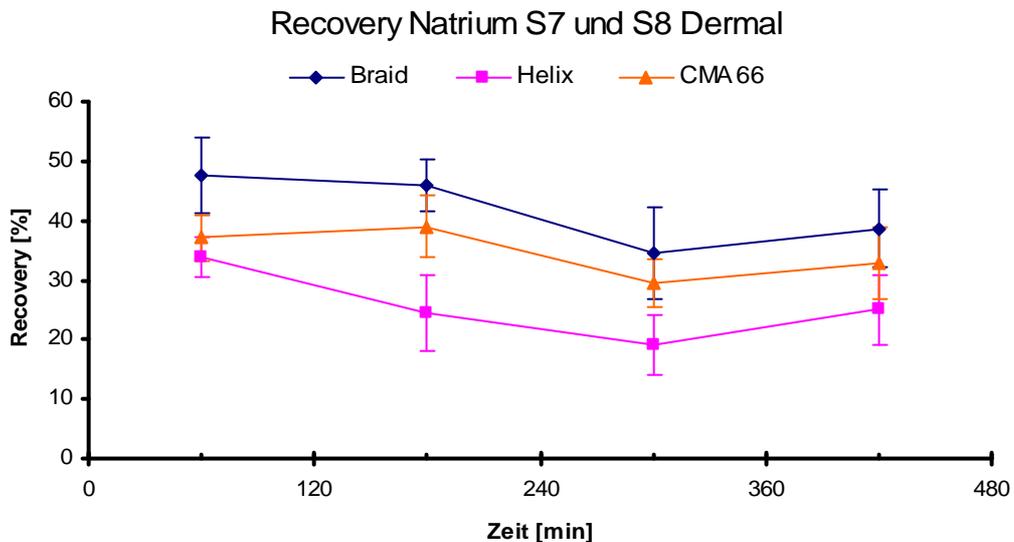


Abb. 73: Vergleich der Na Wiederfindungsraten (Recoveries) (S7, S8) der Braid, Helix und CMA 66 Katheter - dermale Katheter

b) Nachweis der mittelmolekularen Substanz: Inulin

In der Abb. 74 sieht man den Braid Katheter mit einem Maximum bei $39,4\text{mg/l}$, einem Minimum bei $33,7\text{mg/l}$ der gesammelten Inulinkonzentration, mit einer Streuung von $\pm 8,8\text{mg/l}$. Mit dem Helix Katheter wurde eine Inulinkonzentration von maximal 33mg/l und minimal $29,7\text{mg/l}$ gesammelt, mit einer SD von $\pm 7,2\text{mg/l}$. Der CMA 66 Katheter hat ein Maximum bei $36,7\text{mg/l}$ und ein Minimum bei $30,3\text{mg/l}$ der Inulin Konzentration im Gegensatz zum Braid Katheter einer niedrigeren SD von $\pm 5,6\text{mg/l}$. Durch den Braid

Ergebnisse

Katheter wurde ca. 12% der absoluten Inulinkonzentration wiedergefunden mit durchgehend höherem Verlauf als bei dem Helix Katheter, dessen Wiederfindungsrate maximal 10% (Abb. 75) beträgt. Durch den CMA 66 Katheter wurde maximal 11 % der absoluten Inulinkonzentration im subkutanen Fettgewebe wiedergefunden, mit einer Streuung von $\pm 2\%$.

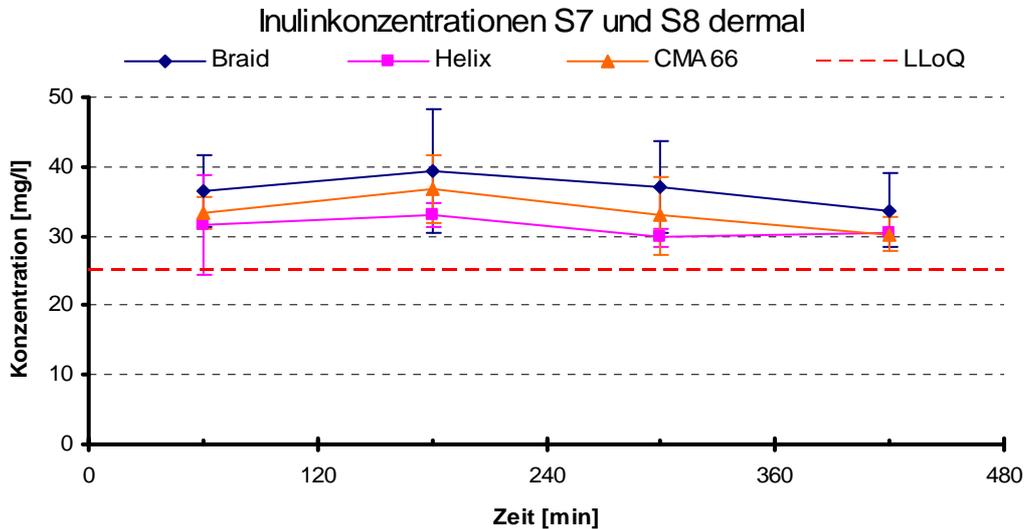


Abb. 74: Vergleich der Inulinkonzentrationen (S7, S8) der Braid, Helix und CMA66 Katheter - dermale Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze

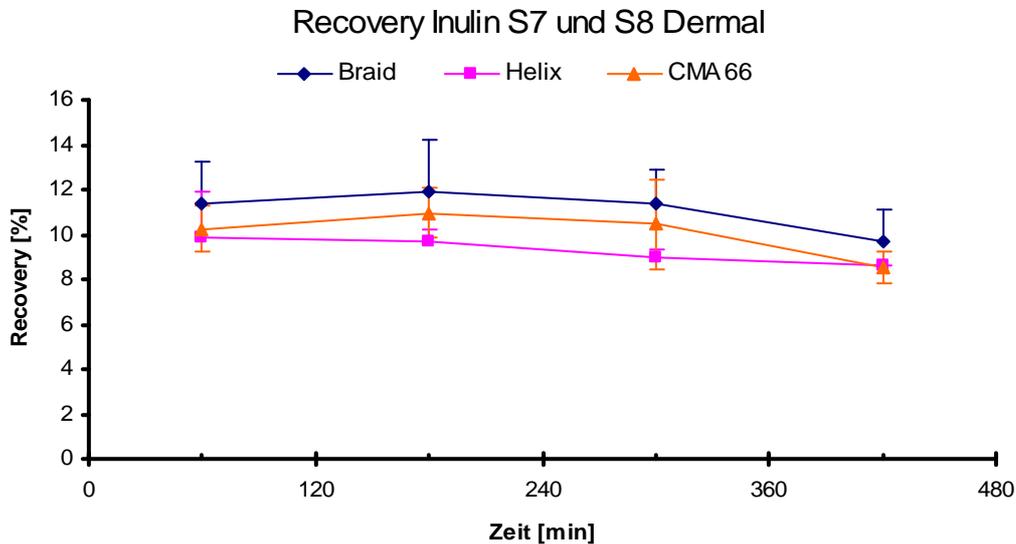


Abb. 75: Vergleich der Inulin Recoveries (S7, S8) der Braid, Helix und CMA66 Katheter - dermale Katheter

c) Nachweis der großmolekularen Substanz: Albumin

Die erhaltenen Albuminkonzentrationen durch die dermalen Braid, Helix und CMA66 Katheter liegen unter dem LLoQ Wert und wurden dementsprechend nicht dargestellt und diskutiert.

3.6.2. Vergleich der Katheter: Subkutanes Sampling

d) Nachweis der kleinemolekularen Substanz: Natrium (Na)

Die Abb. 76 zeigt die Mittelwerte der gesammelten Na-Konzentrationen über zwei Versuche (S7 und S8) mittels den subkutanen OFM Kathetern (Braid, 18G) und MD Katheter (CMA 60) mit dazugehörigen Standardabweichungen. Auf der subkutanen Seite ergibt sich durch den 18G Katheter ein Maximum von 89,8 mmol/l und ein Minimum von 60,4mmol/l der Na-Konzentration mit einer Standardabweichung von $\pm 25,5$ mmol/l. Im Vergleich dazu liefert der Braid Katheter eine Na-Konzentration mit einem Maximum von 73,5mmol/l und einem Minimum von 61,3mmol/l mit einer deutlich höheren Streuung (SD) von 47,5mmol/l. Die gesammelte Na-Konzentration durch den CMA 60 Katheter ist höher als die Konzentration der Braid und 18G Katheter mit dem Maximum bei 120 mmol/l und einem Minimum bei 93,2mmol/l mit einer deutlich niedrigeren Streuung von $\pm 11,4$ mmol/l. Der Verlauf der Wiederfindungsraten ist sehr ähnlich dem Konzentrationsverlauf bis zur dritten Probe (Zeitpunkt 300 min). Die Na Recovery durch den CMA 60 Katheter ist zum Zeitpunkt der vierten Probe (420 min) am höchsten bei 87%. Durch den 18G Katheter wurde ca. 60% und durch den Braid Katheter ca. 45% der absoluten Na-Konzentration im subkutanen Fettgewebe wiedergefunden (Abb. 77)

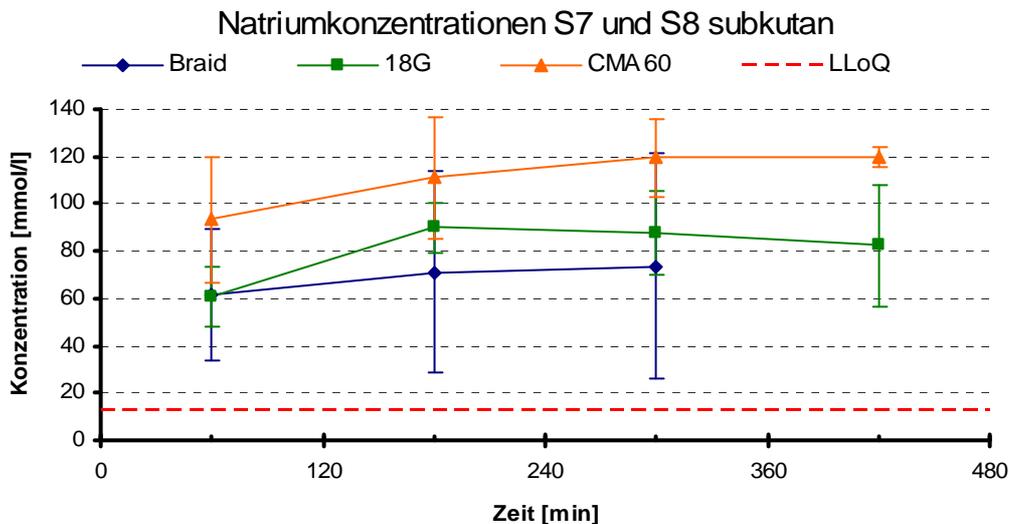


Abb. 76: Vergleich der Na-Konzentrationen (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze

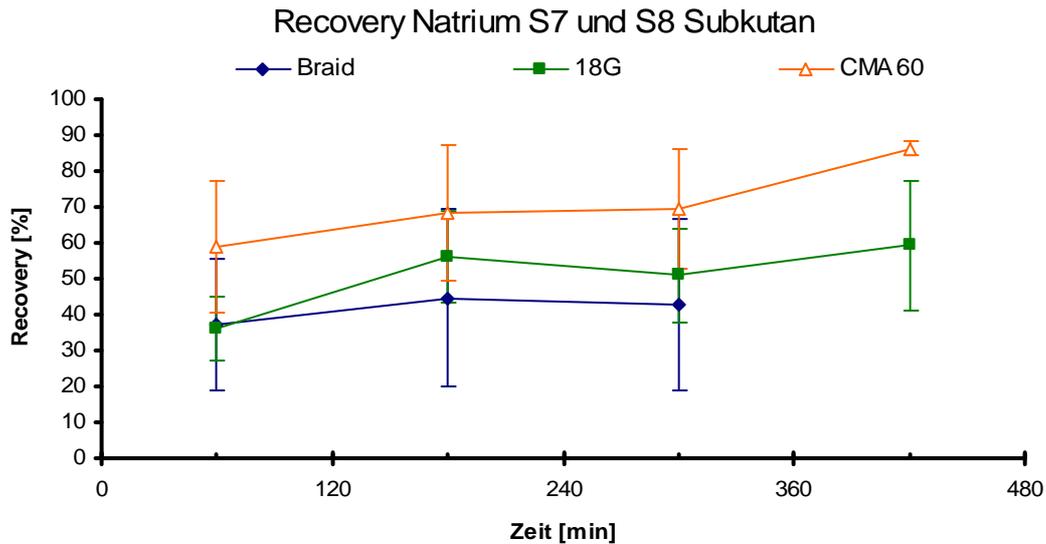


Abb. 77: Vergleich der Na Recoveries (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter - subkutane Katheter

e) Nachweis der mittelmolekularen Substanz: Inulin

In der Abb. 78 sind die Mittelwerte der gesammelten Inulin Konzentrationen über zwei Versuche (S7 und S8) mittels des subkutanen OFM (Braid, 18G) und MD (CMA 60) Katheter mit dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Durch den Braid Katheter ergibt sich ein Maximum von 77,2 mg/dl und ein Minimum von 53,3mg/dl der Inulinkonzentration mit einer Standardabweichung von $\pm 20,6$ mg/dl. Im Vergleich dazu ergeben sich durch den 18G ein Maximum der Inulinkonzentration von 67,7mg/dl und ein Minimum von 40,3mg/dl mit einer hohen Streuung (SD) von 38,9 mg/dl zum Zeitpunkt 300min. Die Inulinkonzentration erhalten durch den CMA 60 Katheter steht bis zum Zeitpunkt der dritten Probe (300 min) oberhalb der Inulinkonzentration des Braid Katheters mit einem Maximum bei 67,4mg/dl und einem Minimum bei 54,2mg/dl mit einer niederen Streuung von $\pm 13,5$ mg/dl. Der Verlauf der Inulin Recovery durch den CMA 60 Katheter ist bis auf die letzte Probe durchgehend höher und beträgt maximal $20,8\% \pm 3\%$. Durch den Braid Katheter wurde $19,2\%$ und durch den 18G Katheter $19,8\%$ der absoluten Inulinkonzentration im subkutanen Fettgewebe wiedergefunden (Abb. 79). Die Streuung der Inulinrecovery durch den 18G Katheter beträgt zum Zeitpunkt 300 min. $\pm 11,5\%$. Beim letzten Sample steigt die Recovery beim Braid Katheter auf 24% .

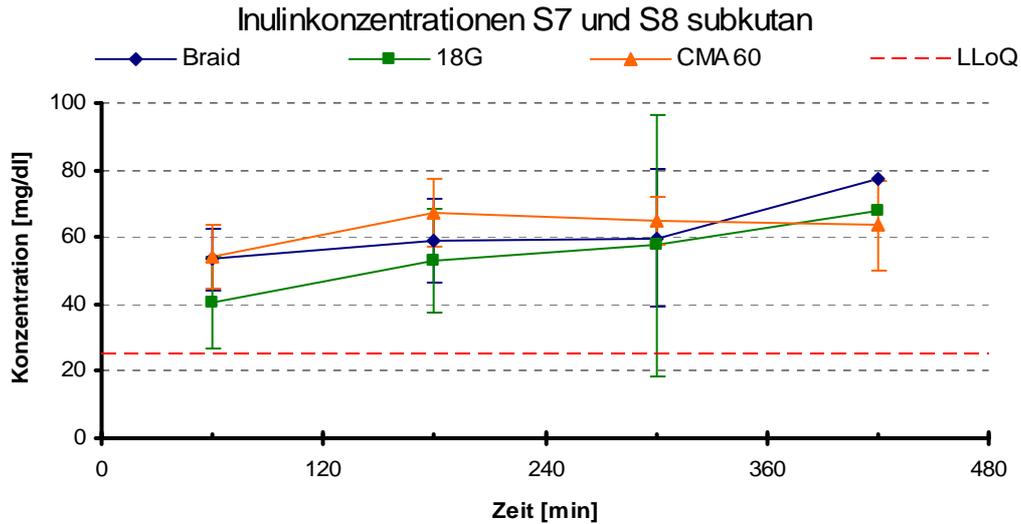


Abb. 78: Vergleich der Inulinkonzentrationen (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze

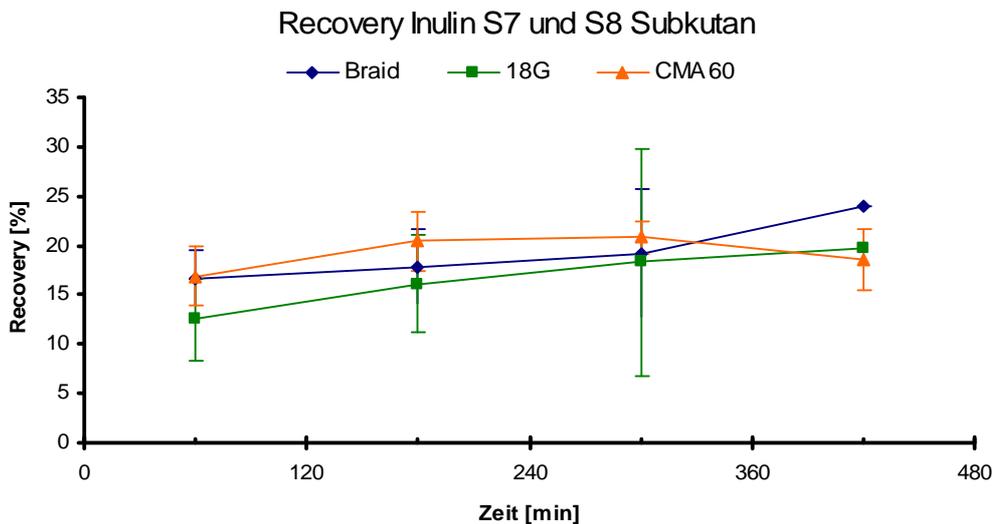


Abb. 79: Vergleich der Inulin Recoveries (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter

f) Nachweis der großmolekularen Substanz: Albumin

In der Abb. 80 ergibt sich durch den Braid Katheter ein Maximum von 0,6g/dl und ein Minimum von 0,4g/dl der Albuminkonzentration mit einer relativ großen Standardabweichung von $\pm 0,5g/dl$. Die Albuminkonzentration erhalten durch den 18G Katheter liegt an und teilweise unterhalb der Nachweisgrenze (LLoQ), die für Albumin 0,08g/dl beträgt (Tabelle 2). Die Albuminkonzentration erhalten durch den CMA 60 Katheter steht unterhalb der Nachweisgrenze (LLoQ). Wie bereits in 2.10 erwähnt wird die Genauigkeit der Werte die unter dem LLoQ liegen in Frage gestellt und deshalb nicht als gültiger Wert angenommen. Die Wiederfindungsrate vom Albumin durch den Braid Katheter in Abb. 81 beträgt Maximal 16,7% mit einer hohen Streuung (SD) von $\pm 20,6\%$.

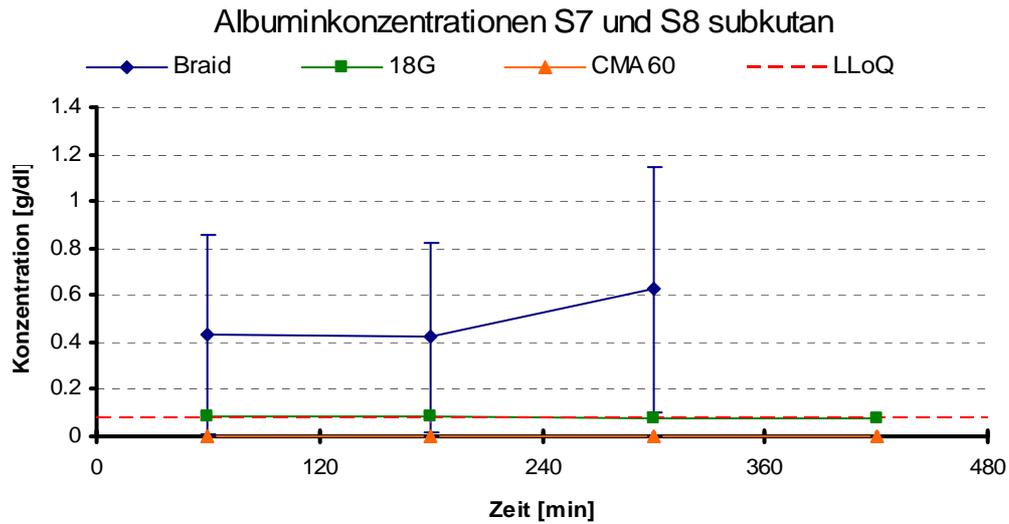


Abb. 80: Vergleich der Albuminkonzentrationen (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter; LLoQ – untere Nachweisgrenze

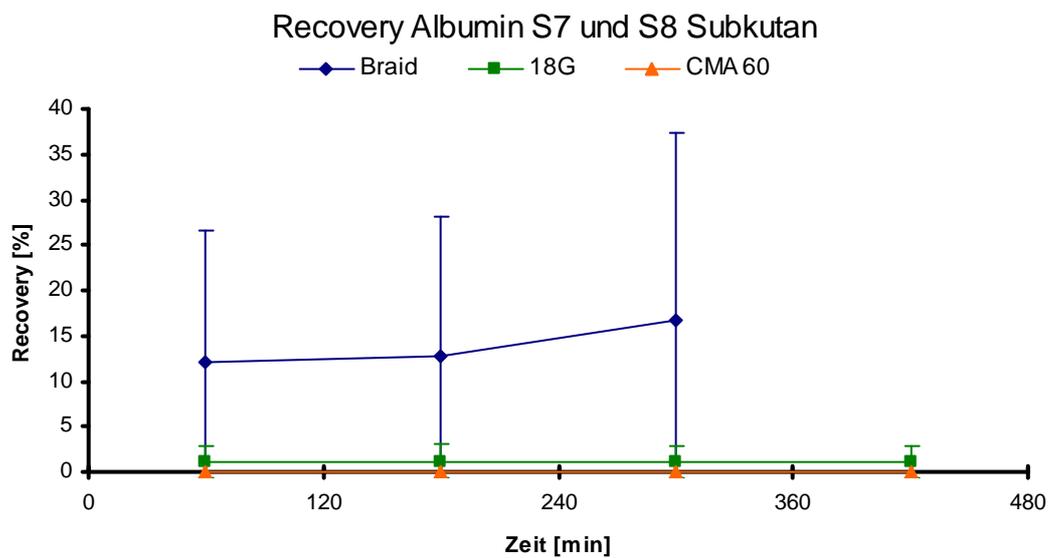


Abb. 81: Vergleich der Albumin Recoveries (S7, S8) der Braid, 18G und CMA60 Katheter – subkutane Katheter

4. Zusammenfassung und Diskussion

4.1. Assemblierung des „Braid Katheter“

Eine der wichtigsten Eigenschaften einer Setznadel bzw. der Übergangsstelle zwischen der Nadel bzw. Kanüle und dem Katheter ist das Verursachen eines möglichst minimalen Setztraumas bei der Implantation. Da das Crimpen der Kanüle eine Verbreiterung der Kanüle und damit eine Vergrößerung der Invasivität verursacht (Abb. 53) wurde die geklebte Unimed Nadel in weiteren Versuchen verwendet. Die Klebestelle zwischen der Unimed Nadel und dem Katheter (Abb. 54) wurde zusätzlich mit einem UV Kleber noch einmal überklebt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten.

4.2. Zugversuche

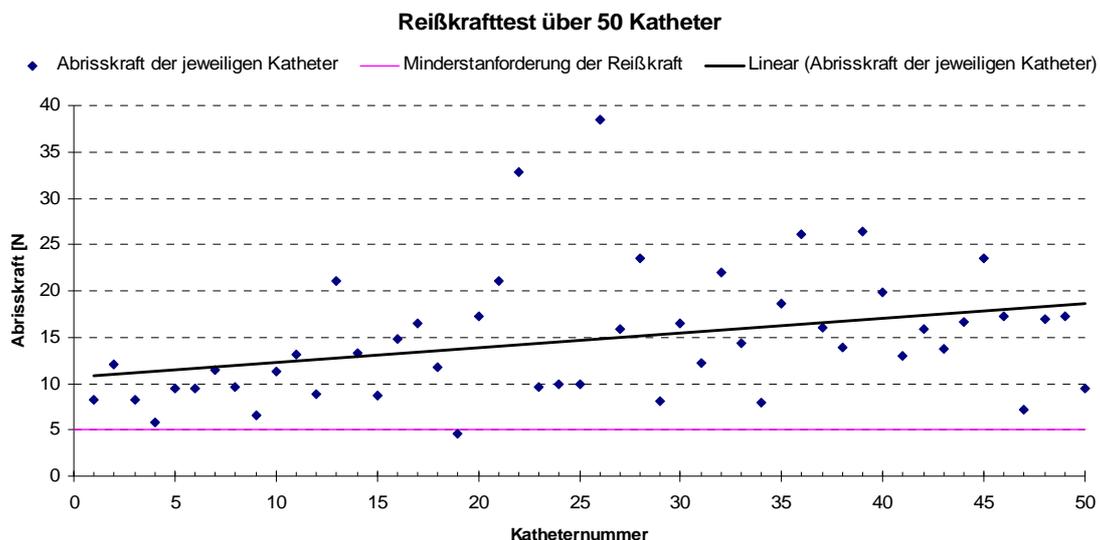


Abb. 82: Trendlinie der Reißkräfte

Von 50 getesteten Kathetern hat ein Katheter die Mindestanforderung einer Abrisskraft von 5N nicht erfüllt (Abb. 55). Laut festgelegten Anforderungen durch in 2.5.1 erwähnten Normen, darf einer der 50 Katheter fehlerhaft sein. Dadurch wurden die Normenanforderungen erfüllt. Als Mittelwert über 50 Katheter ergibt sich eine Abrisskraft von 15N, was der dreifachen Abrisskraft entspricht. Die erhaltenen Ergebnisse der Zugversuche zeigen einen Trend, mit einer fast zweifachen Erhöhung der Abrisskräfte über die Zeit (Abb. 82). Die Einspannvorrichtung für die Katheter wurde am Anfang der Zugversuche nicht optimiert und hat die Katheter beim Einspannen teilweise beschädigt. Die Katheter wurden für das bessere Einspannen mit einem Luerverbinder verklebt und geschützt vor der Klemmbacken der Einspannvorrichtung eingespannt, ohne dass die Schutzmaßnahme die Zugtests beeinflusste. Da die Katheter in einem Intervall von drei Tagen nacheinander geprüft worden sind, lässt sich die Erhöhung der Abrisskraft mit der Zeit durch die Trocknungszeit des Klebers erklären.

4.3. In vitro Flussratenbestimmung

Die Pumpeneinstellung von 0,27 Umdrehungen/min am Versuchsstart hat einen deutlich höheren Wert als gewünscht, da die Flussrate 1,45 µl/min beträgt. In der Abb. 56 ist die Änderung der Pumpeneinstellung (auf 0,21) nach der ersten Probe (bzw. Stunde, gemittelt über die Zeit) deutlich sichtbar. Ab der dritten Probe (Zeitpunkt 150 min, Einstellung 0,19) ist die gewünschte Flussrate von 1 µl/min bis zum Versuchsende konstant geblieben. Somit wurde die genaue Umdrehungszahl der Pumpe für die gewünschte Flussrate für in vivo Versuche für die verwendete Schlauchcharge gefunden. Es ist auch deutlich bemerkbar, dass die Verwendung von Schläuchen verschiedener Innendurchmesser bzw. durch die Herstellungstoleranz der Durchmesser eine andere Pumpeneinstellung benötigt, um die gewünschte Flussrate einzustellen und konstant zu halten. Der Zweck und die Notwendigkeit eines in vitro Versuches zur Bestimmung der Flussgeschwindigkeit für eine verwendete Pumpschlauchcharge vor einem in vivo Versuch wurden somit bestätigt.

4.4. In vivo Flussratenbestimmung - Rattenversuche

Wie in 3.4 erwähnt, resultierte die mittlere Flussrate annähernd 1 µl/min mit einer relativ großen Standardabweichung von $\pm 0,4$ µl/min (Abb. 57). Während der Versuche kam es zu Verstopfungen der Katheter, die mit einem Draht gereinigt und mit einer mit Perfusat gefüllten Spritze durchgespült werden mussten, um das Sampling System wieder zum Laufen zu bringen und die gefragte Flussrate wieder herzustellen. Vor dem Reinigen und Durchspülen der Katheter musste der Push Pull Zweig des jeweiligen Katheters abgebaut werden, um den Katheter zu reinigen und das Weiterlaufen der Katheter herzustellen. Somit kam es zu Verzögerungen beim Sampling, was die gesamte Flussrate des jeweiligen Katheters beeinflusst hat. Daher sind die Abweichungen bei den mittleren Flussraten erklärbar.

4.5. Setzversuche - In vivo Schweineversuche

4.5.1. Der erste Versuch (S01)

Der neue dermale Braid Katheter der Version 1 (AD 0,4mm) wurde in dem Pilotversuch (S01) das erste Mal in die Schweinehaut eingesetzt und in Push-Pull-Mode betrieben. Die erschwerte Setzbarkeit mit der Kanüle AD 0,5mm und das Vorstechen mit einer Kanüle mit AD 0,80 mm verursachen ein großes Setztrauma, was zur Bildung der Entzündungszellen geführt hat, die sich am Innenlumen des Pull-Schlauches anlagern und somit den Abfluss verstopfen. Dadurch wurden die Systeme (Katheter und Pumpschlauch) auf der dermalen Seite schneller und innerhalb 4 Stunden „verstopft“ als die subkutanen Systeme. Die Verstopfungen verursachten eine un stabile Flussrate der dermalen OFM (Braid und Helix) Katheter. Die subkutanen OFM Katheter waren bis auf die letzte Probe stabil. Bei der letzten Probe wurden die subkutanen OFM Katheter verstopft, wodurch die Flussrate zum Schluss gesunken ist.

4.5.2. Der zweite Versuch (S02)

Durch das große Setztrauma verursacht durch die 21G (AD 0,8mm) Kanüle beim S02 kam es zu Einblutungen in den Katheter. Da der Setzdraht vor dem Kontaktieren des Saugschlauches entfernt wurde, wurde durch das Abschneiden des Katheters mit einem Seitenschneider auf der Abflussseite der Katheterausgang verengt. An dieser Verengung konnten sich immer wieder Blutkoagulationen bilden, was in nächsten Versuchen noch untersucht wurde. Bei Bemerkung von Blutkoagulationen im Katheterausfluss wurden diese entfernt bzw. das Ende des Katheters mit einem Seitenschneider abgeschnitten. Zusätzlich wurde der Inhalt des Saugschlauches mit einer Spritze in das Vial geblasen und das Ende des Saugschlauches aus dem Vial entfernt und mit Perfusat durchgespült und gefüllt, um die Sauberkeit des Schlauches sicherzustellen. Nach dem Spülvorgang wurde der Katheter mit dem Saugschlauch wieder kontaktiert und mit dem Sampling fortgesetzt. Bei diesem Versuch wurde auf den Probeninhalt keine Rücksicht genommen, da das Primärziel dieses Versuches der kontinuierliche Betrieb der Katheter war. Nach dem Reinigen der Koagulationen im Katheter mit Setzdraht und der Schläuche mit Perfusat, konnte die Probenflüssigkeit weiter aus dem Katheter gesaugt werden. Die erhaltenen Flowergebnisse konnten in diesem Versuch nur durch ständige Kontrolle der Katheter erzielt werden. Die Katheter, die mit dem 4-fach höheren Flow betrieben wurden (4 μ l/min anstatt 1 μ l/min) waren auch weniger anfällig auf Verstopfungen. Obwohl die Erhöhung der Flussrate weniger Ausfälle der Katheter bewirkte, wurde versucht, soweit möglich, die Flussrate bei 1 μ l/min zu halten. Einerseits werden die MD Katheter in den Studien meistens mit 1 μ l/min betrieben, andererseits wird durch die Erhöhung der Flussrate der Inhalt der Probe verdünnt. Die Polypropylen Pumpschläuche der Firma Raumedic [RAUMEDIC AG, Helmbrechts, Deutschland] mit dem größeren Schlauchinnendurchmesser von 0,25mm zeigten weder eine Verschlechterung noch eine Verbesserung. Eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit von 1 μ l/min auf 2 μ l/min zeigte auch keine merkbare Verbesserung. In diesem Versuch zeigte sich wieder, dass die Katheter auf der subkutanen Seite nicht so verstopfungsanfällig sind als auf der dermalen Seite.

4.5.3. Der dritte Versuch (S03)

Das Setztrauma und die Verstopfungen im System und Beseitigen dieser bei den dermalen Braid Kathetern waren auch das Hauptziel des S03 Versuches. Der angewandte passive Outflow, wo das Rückperfusat direkt nach dem Katheter in ein Probenvial fließt, hat nicht funktioniert. Daher konnten die Katheter Ofm4-Ofm7 nicht im passiven Outflow (ohne Anschließen eines Saugschlauches) betrieben werden und das Perfundieren der ofm8 und ofm9 Katheter musste abgebrochen werden. Das Unterdruck-System konnte auch nicht zufriedenstellend betrieben werden. Die Glaskapillaren sind für eine Flowrate von 0,3 μ l/min und einem Samplingintervall von 1h dimensioniert. Bei einer Flussrate von 4 μ l/min und einem Samplingintervall von 2h in diesem Versuch musste der Wechsel der Glaskapillaren alle 10 min vollzogen werden. Dadurch musste der Unterdruck öfters wieder aufgebaut werden. Wegen der möglichen Verengung des Katheters an der Abflussseite wurde bei S03 Versuch der Katheter an der Zuflussseite gekürzt. Dies führte zu keiner Verminderung der Verstopfung. Es konnten zwar keine Koagulationen an der Katheterausflussseite erkannt werden, aber in die Katheter musste auch öfters ein Draht zum Reinigen eingeführt werden. Dies könnte bedeuten, dass sich durch die längere Ausflusslänge des Katheters mehr Koagulationen oder Zellen direkt im Katheter anlagern können.

4.5.4. Der vierte Versuch (S04)

Aus vorigen Versuchen mit den Außendurchmesser (AD) 0,5mm und 0,8mm Kanülen konnte erkannt werden, dass die Setzlänge von 3cm nicht durchzuführen ist. Deshalb wurden die Katheter beim S04 Versuch mit einer Vollnadel (AD 0,5mm) gesetzt, was den Setzvorgang über eine Setzlänge von 30mm erleichtert hat. Durch das Setzen der Katheter mit den dünneren Nadeln (\varnothing 0,5mm anstatt \varnothing 0,8mm) konnte das Setztrauma sichtbar minimiert werden. Es kam zu weniger bis keinen Einblutungen in den Katheter und damit auch zu keinen Koagulationen im Katheter, Übergang Katheter zu Pumpschlauch und im Pumpschlauch selber. Eine Wartezeit nach dem Kathetersetzen bringt keine merkliche Verbesserung der Flowstabilität über die Samplingzeit. Die Katheter, die schon mit kontaktiertem Push-Schlauch gesetzt und gleich anschließend danach mit dem Pull-Schlauch kontaktiert werden, laufen besser. Bei diesem Versuch konnte der Flow zum ersten Mal während dem Sampling von $4\mu\text{l}/\text{min}$ auf einen Flow von $2\mu\text{l}/\text{min}$ erniedrigt werden (Abb. 68). Im Gegensatz zu S01, S02 und S03 Schweinen, die ca. 60 kg schwere Schweine waren, war das Schwein S04 ein 40kg schweres männliches Schwein. Das leichtere Setzen der Katheter und das geringere Setztrauma, das sich durch deutlich stabilere Flussrate der dermalen Katheter im Vergleich zum vorigen Versuchen äußert, liegt in der Tatsache, dass die Haut an der Setzfläche eines 40 kg schweren Schweins deutlich weicher ist, als die zähe Haut eines 60 kg schweren Schweins. Die Schlussfolgerung der S04 Versuches zeigt, dass das Setztrauma vom Schweinegewicht, bzw. Weichheit der Haut und von der Setztechnik abhängig ist. Die Größe/Stärke des Nadelhalters beeinflusst den Abstand der Nadel zur Oberfläche der Haut während des Setzens und somit die Setztiefe (Abb. 83).



Abb. 83: Abstand der Nadel zur Hautoberfläche beim Setzen hervorgerufen durch die Stärke/Größe des Nadelhalters

4.5.5. Der fünfte Versuch (S05)

Es wurde wieder bewiesen, dass das Setzen an dem leichteren männlichen Schwein (ca. 40kg) leichter und oberflächlicher durchgeführt werden kann. Der Setzvorgang wurde durch vorige Versuche optimiert und an leichteren Schweinen mit weniger Kraft und Aufwand wegen der weicheren Haut durchgeführt. Somit wurden die Setztrauma und die auftretende Koagulationen verringert, mit dem Ergebnis von wenigen bis zu keinen Verstopfungen. Als

Schlussfolgerung im Vergleich zu anderen Versuchen, wurden beim S05 Versuch durchgehend annähernd stabile Flussraten erreicht. Weiters wurde die Sterilisation der Braid Kathetern vor dem S05 Versuch diesmal mit einem Autoklaven durchgeführt. Da das Autoklavieren für die thermische Behandlung von Stoffen im Überdruckbereich zum Sterilisieren eingesetzt wird, wurde die Klebestelle zwischen Katheter und Nadel ausgehärtet und ausgetrocknet, was zum massiven Abreißen der Katheter beim S05 Versuch geführt hat. Im vorigen Versuchen wurden einige Katheter während dem Setzvorgang abgerissen, aber nur aufgrund einer großen Reibung zwischen Kanüle und der Haut während des Setzens, oder einer fehlerhaften Assemblierung, jedoch nie wegen der Sterilisation und nicht in solchem Maß als beim S05 Versuch.

4.5.6. Der sechste Versuch (S06)

Der S06 Versuch zeigte wieder dass, die Setzbarkeit durch das Auflegen von einem mit Alkohol (Skinsept® pur Ecolab GmbH) getränkten Tupfer verbessert wird. Der Tupfer durfte erst kurz vor dem Setzen entfernt werden. Wenn die Haut wieder ausgetrocknet wird, konnte durch kurzzeitiges Auflegen eines Alkohol-Tupfers ein besserer Erfolg erzielt werden. Die Katheter konnten nicht nur oberflächlicher gesetzt werden, auch das Nachziehen des Katheters, wenn die Nadel schon aus der Ausstichstelle ausgezogen wird, konnte verbessert werden. Die Haftreibung zwischen Nadel und Haut konnte minimiert werden, und somit auch das Abreißen der Katheter. Wichtig beim Setzen war auch ein geeigneter Nadelhalter. Ein optimaler Nadelhalter sollte nicht zu groß und klobig sein, damit der Abstand der Nadel zur Oberfläche der Haut (Abb. 83) zu groß wird. Dadurch wird die Einstichstelle zu sehr aufgeweitet und auch das Trauma wird vergrößert. S06 war ein weibliches ca. 40 kg schweres Schwein. Der Setzvorgang am weiblichen Schwein (S06) im Vergleich zum Setzvorgang bei den männlichen Schweinen (S04 und S05) ergab keinen Unterschied, außer einer geübten und optimierten Setztechnik.

Aus diesen sechs Setzversuchen (S1-S6) wurden das Versuchssetup und die Versuchsdurchführung der Schweineversuchsreihe optimiert, die Hindernisse beseitigt und ein verbessertes Samplingsystem (Tabelle 4) für eine kontinuierliche Probengewinnung entwickelt.

4.6. In vivo Schweineversuche - Nachweis der klein-, mittel-, und großmolekularen Substanzen mittels Wiederfindungsrate (Recovery)

4.6.1. Vergleich der Katheter: Dermales Sampling

		Braid	Helix	CMA66
maximale Recovery dermal	Natrium	48%	39%	34%
	Inulin	12%	10%	11%
	Albumin	<LLoQ	<LLoQ	<LLoQ

Tabelle 5: Maximale Recovery Wert der dermalen OFM und MD Katheter
<LLoQ: Unter der Nachweisgrenze

Durch den Braid Katheter erhält man eine höhere Na-Konzentration und Wiederfindungsrate, im Vergleich zu Helix und CMA66 Katheter (Tabelle 5). Die erhaltenen Albuminkonzentrationen durch die dermalen Braid und Helix Katheter liegen unter dem LLoQ und wurden dementsprechend nicht diskutiert. Als Ergebnis liefert der neue OFM Braid Katheter höhere klein- (Na) und mittelmolekulare (Inulin) Konzentrationen als der alte OFM Helix und dementsprechend höhere Wiederfindungsraten. Die erhaltenen Daten zeigen, dass der neue Braid Katheter mit dem am Markt etablierten CMA 66 Katheter vergleichbare Ergebnisse bei den klein- und mittelgroßen Substanzen liefert.

4.6.2. Vergleich der Katheter: Subkutanen Sampling

		Braid	18G	CMA60
maximale Recovery subkutan	Natrium	45%	60%	87%
	Inulin	24%	20%	21%
	Albumin	17%	<LLoQ	<LLoQ

Tabelle 6: Maximale Recovery Wert der subkutanen OFM und MD Katheter <LLoQ: Unter der Nachweisgrenze

Die erhaltenen Na Konzentrationen durch den CMA 60 Katheter waren während der beiden Versuche (S7, S8) höher als bei dem Braid Katheter, mit einer um ca. 40 % höheren Wiederfindungsrate (Tabelle 6). Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass die CMA 60 MD-Membran einen größeren Durchmesser von 0,6mm und eine größere Länge von 30mm hat. Damit ist die Austauschfläche der MD um einen Faktor von ca. 3 größer als die Austauschfläche der OFM. Bei dem subkutanen Sampling zeigt der neue Braid Katheter keinen merklichen Vorteil zum alten OFM Katheter, als beim dermalen Sampling. Die gesammelten Na-Konzentrationen (Abb. 76) durch den subkutanen 18G Katheter sind durchgehend höher mit einer Recovery von 60 % als durch den Braid Katheter mit der Recovery von 45%. Wie schon in 2.10 besprochen, wurden die Werte, bei deren Samplingintervall das Samplingsystem manipuliert wurde, aus der Berechnung ausgeschlossen. Deshalb wird beim Braid Katheter zum Zeitpunkt 300 min. kein Wert angezeigt (Abb. 76; Abb. 80). Der Nachweis vom Makromolekül Inulin aller subkutanen Katheter ist annähernd gleich, mit einem Performanceunterschied von 1% bis 4% (Abb. 75). Die Recovery der absoluten Albuminkonzentration (Abb. 81) im subkutanen Fettgewebe, obwohl nur ca. 17 %, ist trotz einer großen Streuung ein hoher Wert. Bezogen auf die frühere klinische Studie, wurde mit dem 18G Katheter 15% des Albumins im Subkutis erreicht [16] Die Albuminkonzentration (präklinisch) durch den subkutanen 18G Katheter war unter der Nachweisgrenze (Tabelle 6). Daher ist bei Albumin bei einer klinischen Studie ein höherer Wert durch den Braid Katheter zu erwarten. Zusammenfassend, zeigt der neue Braid Katheter beim subkutanen Sampling eine bessere Performance bei Mittel- und Großmolekülen.

5. Schlussfolgerung

Durch die Anwendung des Katheters in Tierversuchen wurde die Verbindung mit der Setznadel weiterentwickelt und abrißfest hergestellt. Durch Zugversuche wurde bewiesen, dass der neue Katheter den Mindestanforderungen der ÖNORM EN 1618:1997⁴ entspricht. Der neue, teilweise maschinell gefertigte Braid Katheter bietet den Vorteil einer reproduzierbaren Austauschfläche, damit einer präzisen Probenextraktion und ist darüber hinaus kostengünstiger als die Vorgängermodelle (Helix und 18 G) herzustellen. Neben der maschinellen Herstellbarkeit des Katheterschlauches und dessen Austauschfläche ist der neu entwickelte Mikroperfusionskatheter aufgrund seiner geringen Abmessungen für die dermale Anwendung im Tiermodell sehr gut geeignet. Wegen seiner hohen Flexibilität und Zähigkeit kann der Katheter einfach und sicher in die Haut implantiert werden. Durch das Beseitigen ständig auftretenden Probleme wie Verstopfungen durch Koagulationen, instabile Flussraten und erschwerte Implantation bei den ersten sechs Schweineversuchen, wurde ein verbessertes Samplingsystem für die kontinuierliche Probengewinnung aufgebaut und eine optimale Setzprozedur trainiert.

Im Bereich des dermalen Sampling des kleinmolekularen Natriums zeigt der neue Braid Katheter eine bis zu 10% (verglichen mit OFM ‚alt‘) bzw. 15% (verglichen mit MD) höhere Recovery (Tabelle 5). Wegen einer größeren Austauschfläche zeigten die konzentrischen subkutanen OFM (18G) und MD (CMA60; um ca. Faktor 3 höherer Austauschfläche) Katheter eine bis zu 15% (OFM) bzw. 42% (MD) höhere Recovery, im Vergleich zum linearen Braid Katheter (Tabelle 6). Alle Katheter haben beim Makromolekül Inulin vergleichbare Performance gezeigt, sowohl im dermalen, als auch im subkutanen Sampling. Im Vergleich zu OFM ‚alt‘ und MD, zeigte der Braid Katheter einen relativ hohen Nachweis vom Albumin beim subkutanem Sampling, mit einer Recovery von 17%. Somit wurde bewiesen, dass subkutan großmolekulare Substanzen gesammelt werden können.

Die erhaltenen Ergebnisse der letzten zwei Versuche lassen die Vermutung zu, dass der neue OFM Braid Katheter im Vergleich zum OFM ‚alt‘ (Helix) und zur MD (CMA66) in der dermalen Anwendung eine höhere Recovery erzielen kann. Der neue Braid Katheter konnte seine Stärken in der subkutanen Anwendung erst für größere Moleküle zeigen. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse und daraus ableitende Vermutungen zu untermauern ist allerdings eine Studie mit höherer Fallzahl durchzuführen. Ob die Methode der „Offenen Mikroperfusion“ ein universelles „Werkzeug“ zur Untersuchung der PK und PD für eine Vielzahl von Wirkstoffen für die dermale Anwendung ist und damit als eine Alternative zur Mikrodialyse verwendet werden kann, soll in weiteren Arbeiten gezeigt werden.

⁴ ÖNORM EN 1618:1997: Nicht-intravasaler Katheter Prüfverfahren für allgemeine Eigenschaften

6. Literaturverzeichnis

1. **Orfanos, C. E.** Stand und Perspektiven der Dermatologie in Deutschland. JDtschen Dermatol Ges. 2(6), 434-439. 2004.
2. **De BJ, Korf J and Plijter-Groendijk H.** In vivo monitoring of lactate and glucose with microdialysis and enzyme reactors in intensive care medicine. *Int J Artif Organs* 17: 163-170, 1994.
3. **Rosenbloom AJ, Sipe DM and Weedn VW.** Microdialysis of proteins: performance of the CMA/20 probe. *J Neurosci Methods* 148: 147-153, 2005.
4. **Rosenbloom AJ, Ferris R, Sipe DM, Riddler SA, Connolly NC, Abe K and Whiteside TL.** In vitro and in vivo protein sampling by combined microdialysis and ultrafiltration. *J Immunol Methods* 309: 55-68, 2006.
5. **Chaurasia CS, Muller M, Bashaw ED, Benfeldt E, Bolinder J, Bullock R, Bungay PM, DeLange EC, Derendorf H, Elmquist WF, Hammarlund-Udenaes M, Joukhadar C, Kellogg DL, Jr., Lunte CE, Nordstrom CH, Rollema H, Sawchuk RJ, Cheung BW, Shah VP, Stahle L, Ungerstedt U, Welty DF and Yeo H.** AAPS-FDA Workshop White Paper: microdialysis principles, application, and regulatory perspectives. *J Clin Pharmacol* 47: 589-603, 2007.
6. **Bodenlenz, M., Sinner, F., Magnes, C., Druml, T., Gruendhammer, T., Schaller, H. C., Wutte, A., Ellmerer, M., Regittnig, W., Schaupp, L., Wach, P., and Pieber, T. R.** Open-Flow Microperfusion: An alternative approach with unrestricted access to interstitial fluid enabling sampling of protein-bound and higher molecular weight agents. Clin.Pharmacol.Ther- Abstract of presentation at 4th International Symposium on Microdialysis, June 18th-19th, 2004, Vienna, Austria 47(7), 398. 2004.
7. **Ellmerer M, Schaupp L, Sendlhofer G, Wutte A, Brunner GA, Trajanoski Z, Skrabal F, Wach P and Pieber TR.** Lactate metabolism of subcutaneous adipose tissue studied by open flow microperfusion. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4394-4401, 1998.
8. **Gruendhammer T.** Weiterentwicklung der dermalen Offenen Mikroperfusion (OFM) und Quantifizierung kleiner Moleküle in der Haut (Diplomarbeit). TU Graz, 2004.
9. **Hoefflerer C.** Untersuchung des transdermalen Transportes von großmolekularen und lipophilen Substanzen mit der offenen Mikroperfusionstechnik (Diplomarbeit). TU Graz, 2006.
10. **Bodenlenz M, Schaupp LA, Druml T, Sommer R, Wutte A, Schaller HC, Sinner F, Wach P and Pieber TR.** Measurement of interstitial insulin in human adipose and muscle tissue under moderate hyperinsulinemia by means of direct interstitial access. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E296-E300, 2005.
11. **Bodenlenz, M., Schaller, H. C., Wutte, A., Jacobsen, L. V., Druml, T., Meinitzer, A., Plank, J, Balent, B., Brandmair, J., Brunner, G. A., Schaupp, L., Wach, P., and Pieber, T. R.** Measurement of insulin detemir and human insulin in adipose and muscle tissue of diabetic patients using open-flow microperfusion. *Diabetologia* Vol.45 (suppl.2), A257. 2002.
12. **Bodenlenz, M., Schaupp, L. A., Hoefflerer, C., Schaller, R., Feichtner, F., Magnes, C., Suppan, M., Pickl, K., Sinner, F., Wutte, A., Korsatko, S., Koehler, G., Legat, F. J., Hijazi, Y., Neddermann, D., Jung, T., and Pieber, T. R.** A novel approach for investigations into skin barrier function and drug penetration. Poster Presentation at the 3rd Symposium of Skin and Formulation & 10th Annual meeting of the Skin Forum, Versailles, France, 9-10 March . 2009.
13. **Lonnroth P and Strindberg L.** Validation of the 'internal reference technique' for calibrating microdialysis catheters in situ. 117. *Acta Physiol Scand* 153: 375-380, 1995.

14. **Schaupp L, Ellmerer M, Brunner GA, Wutte A, Sendlhofer G, Trajanoski Z, Skrabal F, Pieber TR and Wach P.** Direct access to interstitial fluid in adipose tissue in humans by use of open-flow microperfusion. *Am J Physiol* 276: E401-E408, 1999.
15. **Bodenlenz, M., Schaller, H. C., Wutte, A., Druml, T., Meinitzer, A., Plank, J., Brandmair, J., Balent, B., Schlack, C., Schaupp, L., Wach, P., and Pieber, T. R.** Validierung von Inulin als externe Referenz für die interstitielle Messung von Makromolekülen mittels Offener Mikroperfusion. *Acta Med.Austriaca suppl.*55. 2001.
16. **Ellmerer M, Schaupp L, Brunner GA, Sendlhofer G, Wutte A, Wach P and Pieber TR.** Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E352-E356, 2000.
17. **Groth L, Jorgensen A and Serup J.** Cutaneous microdialysis in the rat: insertion trauma and effect of anaesthesia studied by laser Doppler perfusion imaging and histamine release. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 11: 125-132, 1998.
18. Guidance for Industry, Bioanalytical method validation, US Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration 13593. 2001.
19. <http://de.wikipedia.org/wiki/Haut>; 25.08.2008.
20. **Schmook FP, Meingassner JG and Billich A.** Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* 215: 51-56, 2001.
21. **Bodenlenz, M., Sommer, R., Wutte, A., Druml, T., Sinner, F., Plank, J., Schaller, H. C., Schaupp, L., Wach, P., and Pieber, T. R.** Quantification of the Human Insulin concentration in adipose and muscle tissue of healthy subjects by means of the No-Net- Flux calibration technique and Open-Flow Microperfusion. The 18th International Diabetes Federation Congress, Paris, France, 24-29 August 2003, *Diabetologia*, Vol.46, suppl.2, A203, August 2003

7. Appendix

Flussraten und Katheteranordnung der Versuche S1 bis S6

Die Versuche am Schweinmodell wurden an 8 Schweinen durchgeführt, die man als Subjects (S) bezeichnet hat. Eingestellte Flowrate zur Probenmenge im Rückperfusat wurde durch Abwiegen der Proben vor und nach dem Versuch kontrolliert. Im Prüfprotokoll sind die eingestellten Flussraten und Schläuche für den jeweiligen Versuch genau beschrieben.

S01

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Helix	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Dermal	Md1-Md3	CMA 66	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm10-Ofm12	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm13-Ofm15	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md4-Md6	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 7: Prüfprotokoll für S01 Versuch

S02

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Braid	Push-Pull	4µl/min	Tygon ID0,19
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Push-Pull	Ca.1,5µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm13-Ofm15	Braid	Push-Pull	2µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm7-Ofm9	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm10-Ofm12	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md4-Md6	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 8: Prüfprotokoll für S02 Versuch

S03

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Braid	Push-Pull	1µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Unterdruck	1µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm7-Ofm9	Braid	Passiv Outflow	1µl/min – 4 µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm10-Ofm12	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm13-Ofm15	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md1-Md3	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 9: Prüfprotokoll für S03 Versuch

S04

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Braid	Push-Pull	4µl/min Später kontaktiert	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Push-Pull	4µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm7-Ofm9	Braid	Push-Pull	4/2µl/min	Polypropylen ID0,25
Subkutan	Ofm10-Ofm12	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm13-Ofm15	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md1-Md3	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 10: Prüfprotokoll für S04 Versuch

S05

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Braid	Push-Pull	4µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Push-Pull	4µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm7-Ofm9	Braid	Unterdruck	2µl/min	Polypropylen ID0,25
Subkutan	Ofm10-Ofm12	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm13-Ofm15	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md1-Md3	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 11: Prüfprotokoll für S05 Versuch

S06

Implantations-Seite	Katheter Nummer	Katheter	System	Flowrate	Schlauch
Dermal	Ofm1-Ofm3	Braid	Push-Pull	2µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm4-Ofm6	Braid	Push-Pull	2µl/min	Polypropylen ID0,25
Dermal	Ofm7-Ofm9	Braid	Unterdruck	1µl/min	Polypropylen ID0,25
Subkutan	Ofm10-Ofm12	Braid	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Ofm13-Ofm15	18G	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19
Subkutan	Md1-Md3	CMA 60	Push-Pull	1µl/min	Tygon ID0,19

Tabelle 12: Prüfprotokoll für S06 Versuch