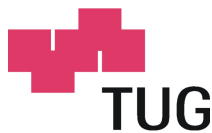


Diplomarbeit

# Aufbau und Evaluierung eines OFM-Systems im zentralen Nervensystem der Ratte

Thomas Kroath



Institut für Medizintechnik  
Technische Universität Graz  
Kronesgasse 5, 8010 Graz, Austria



HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften  
Biomedizinische Technik und Monitoring  
Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH  
Elisabethstraße 11A, 8010 Graz, Austria

Betreuer (JR): Dipl.-Ing. Thomas Birngruber  
Begutachter (TUG): A.o. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

Graz, März 2011

## Danksagung

Die Diplomarbeit entstand im Auftrag des Instituts für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften (HEALTH) der Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH. Diese Seite ist all jenen gewidmet, die es mir ermöglichten diese Arbeit durchzuführen.

Mein aufrichtigster Dank gilt Thomas Birngruber, der mich bei dieser Arbeit mit aller Kraft unterstützt und gefördert hat, mir mit fachlichem Rat und sachlicher Kritik zur Seite stand und obendrein ein guter Freund ist. Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts HEALTH für ihre Unterstützung danken.

Für die Benutzung der Labors und die Möglichkeit Versuche in professioneller Umgebung durchführen zu können, möchte ich mich beim Clinical Research Center am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz, unter der Leitung von Herrn Dr. Stefan Korsatko, bedanken. Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz für die Benutzung der Infrastruktur und die Unterstützung bei der Durchführung der in-vivo Versuche bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die während meines Studiums immer an mich geglaubt haben.

Dank an Georg, Andi, Flo, Stefan und Martin - es war mir eine Ehre mit Euch studiert zu haben.

Das größte Dankeschön gehört meiner liebsten Corinna für ihre Liebe, ihre Unterstützung und einfach alles - ILD.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Tochter Emma, dass sie mich mit ihrer kindlichen Neugier ansteckt und mir jeden Tag ihr schönstes Lachen schenkt.

## Abstract

**Zusammenfassung:** Die zerebrale offene Mikroperfusion (cOFM) ist eine neue minimalinvasive und kostengünstige Technik zur kontinuierlichen Beobachtung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik im Gehirn und soll das Spektrum der bereits etablierten Methoden erweitern. Sie bietet einen dauerhaften und wiederverwendbaren Zugang zum Gehirn über den sowohl Substanzen, unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, eingebracht werden, als auch Substanzen aus der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns entnommen werden können. Es wurde ein System aufgebaut, das die Messung von Substanzen im zentralen Nervensystem von Ratten ermöglichte. Während der Messung wird eine spezielle Flüssigkeit (=Perfusat) über den Kathetereinsatz in das Gehirn eingebracht und gleichzeitig über den selben Kathetereinsatz wieder abgesaugt. Aus dem umspülten Hirngewebe gelangen Substanzen in das Perfusat, welches in Probenbehältern gesammelt und chemisch analysiert wird. Durch Optimierung der Katheterspitze wurde verhindert, dass beim Einbringen des Kathetereinsatzes das Hirngewebe neuerlich traumatisiert wird, wodurch das Messergebnis verfälscht würde. Es wurden Versuche durchgeführt, um die Funktionalität des Messsystems in-vitro und in-vivo zu zeigen. Es zeigte sich, dass das System sowohl in-vitro als auch in-vivo in narkotisierten Tieren zuverlässig funktioniert. Für die Messung in wachen, sich frei bewegenden Tieren ist das System nicht geeignet.

**Schlüsselwörter:** *Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Blut-Hirn-Schranke, Mikroperfusion, Katheter*

**Abstract:** The cerebral open flow microperfusion technique is an innovative, minimal invasive and low cost method for continuous monitoring of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the brain. cOFM allows application of substances into the brain bypassing the blood brain barrier as well as measurement of transport over blood brain barrier. cOFM provides a re-usable access port for long term measurements. In this work, the established OFM method for measuring in the interstitial fluid of the skin was adapted for the use inside the brain. During measuring, a special fluid (=perfusate) is pumped into the brain by the use of a catheter inlet and withdrawn at the same time and flow rate by the same catheter inlet. Substances diffuse out of the flushed tissue into the perfusate, which is sampled in vials and analysed later. The optimization of the catheter allowed measurement inside intact blood brain barrier. Experiments showed that the system works properly in-vitro as well as in-vivo, with anaesthetised animal. The system is not applicable for measurement in awake and freely moving animal.

**Keywords:** *pharmacokinetics, pharmacodynamics, blood brain barrier, microperfusion, catheter*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>4</b>
2.1	State Of The Art . . . . .	4
2.2	cOFM - System . . . . .	7
2.3	cOFM - Katheter . . . . .	10
2.3.1	Aufbau & Funktion . . . . .	10
2.4	In-vitro . . . . .	17
2.4.1	Pilotversuch . . . . .	17
2.4.2	Hauptversuch . . . . .	25
2.5	In-vivo . . . . .	27
2.5.1	Hirnperfusat . . . . .	27
2.5.2	Implantation . . . . .	28
2.5.3	Ionic Reference . . . . .	36
2.5.4	Messung in wachen Tieren . . . . .	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	In-Vitro . . . . .	50
3.1.1	Pilot-Versuch . . . . .	50
3.1.2	Hauptversuch . . . . .	51
3.2	In-Vivo . . . . .	53
3.2.1	Ionic Reference . . . . .	53
3.2.2	Messung in wachen Tieren . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Das Gehirn ist die zentrale Instanz im menschlichen Körper. Aus diesem Grund haben Erkrankungen, die das Gehirn und seine Funktionen beeinträchtigen, oft massive Auswirkungen auf die Lebenserwartung und die Lebensqualität der Betroffenen sowie deren Angehörigen. Weltweit sind Millionen Menschen davon betroffen. Die Erforschung dieser Erkrankungen, sowie die Suche nach geeigneten Therapiemethoden, ist ein komplexes Aufgabenfeld. Die Forschungsgruppe Alzheimer's Disease International (ADI) hat in ihrem Bericht (2009) errechnet, dass 2010 35,6 Mio. Menschen demenzkrank sein werden. Damit wurde der bis dorthin gültige Wert um 10% nach oben korrigiert. Dem neuen Bericht zufolge verdoppelt sich alle 20 Jahre die Zahl der Betroffenen deshalb wird in diesem Bericht gefordert, der Erforschung der Demenz sowie vorbeugender Maßnahmen höchste Priorität beizumessen.

Die *zerebrale offene Mikroperfusion (cOFM)* ist eine neue minimalinvasive Technik zur kontinuierlichen Beobachtung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik im Gehirn. Die BHS (Blut Hirn Schranke) stellt ein hochselektives Filter dar, welches das Gehirn vor dem Eindringen von Krankheitserregern und Toxinen schützt, andererseits erschwert die BHS die medikamentöse Behandlung von neurologischer Erkrankungen, da auch sehr viele Wirkstoffe die BHS nicht passieren können. Seitens der pharmazeutischen Industrie besteht großes Interesse an einer kontinuierlichen Samplingtechnik zur Messung des Sub-

stanztransports über die intakte BHS, zumal bestehende Techniken hier Einschränkungen aufweisen. Gegenwärtig ist die Mikrodialyse [15] die am weitesten verbreitete Methode um Medikamente oder andere Moleküle in der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) des Gehirns zu untersuchen. Diese Methode wird in großem Umfang in präklinischen Experimenten an Versuchstieren sowie in klinischen Studien am Menschen eingesetzt, um die Pharmakokinetik (Verteilung/Konzentration) als auch die Pharmakodynamik (Wirkung) von Medikamenten in den interessierenden Geweben zu untersuchen, bevor das Medikament zugelassen und mit Dosierungsvorschriften auf den Markt gebracht werden kann. Es ist allerdings ein Faktum, dass die Mikrodialyse schwerwiegende Limitierungen aufweist. Die Verwendung von semi-permeablen Membranen bei der Mikrodialyse schließt viele körpereigene Substanzen von der Messung (mittel- bis großmolekulare, proteingebundene und vor allem lipophile Moleküle)[14][2] aus.

Das Institut HEALTH der Joanneum Research Forschungsgesellschaft m.b.H. hat in den beiden vergangenen Jahren, basierend auf bereits bestehenden OFM Messsystemen in Haut- und Fettgewebe eine Anwendung der OFM im Gehirn entwickelt. Die cOFM bietet einen dauerhaften und wieder verwendbaren Zugang zum Gehirn, über den sowohl Substanzen direkt (unter Umgehung der BHS) ins Gehirn eingebracht werden können, als auch pharmakodynamische und pharmakokinetische Parameter im Hirngewebe kontinuierlich gemessen werden können. Die kontinuierliche Messung in einem Subjekt erlaubt eine starke Reduktion der Versuchstieranzahl gegenüber der Serienbiopsie, bei der zu jedem Messzeitpunkt ein Tier getötet werden muss. Ein großes und facettenreiches Anwendungsgebiet für die cOFM sind neurodegenerative Erkrankungen und deren Zusammenhang mit Neuroinflammation. Störungen der Barrierefunktion der BHS können bei vielen neurologischen Erkrankungen oder auch nach Gehirnverletzungen (Trauma) auftreten. Eine Reihe von Erkrankungen des ZNS manifestiert sich durch die Transmigration von Erregern über die BHS. Bakterielle Erreger können schwere Meningitis mit all ihren assoziierten Komplikationen auslösen, bei denen inflammatorische Vorgänge eine ganz wesentliche Rolle spielen [19]. Auch Viren (HI-Virus, West-Nil Virus, HTL Virus) sind dazu in der Lage, die BHS

zu überwinden und die Funktion des Zentralnervensystem durch entzündliche Vorgänge zu schädigen [6]. Im Fall der Multiplen Sklerose (MS) sind die auslösenden Zellen Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr, die die BHS überwinden. MS ist eine entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS, bei der vor allem T-Zellen beteiligt sind, die über die BHS migrieren.

Bei den oben angeführten Krankheitsbildern sind entzündliche Vorgänge beteiligt, bei denen es zur Freisetzung von Mediatoren (Cytokine, Interleukine, Chemokine) im Gehirn kommt. Ein Real-Time Monitoring der Konzentrationen dieser Substanzen in der interstitiellen Gehirnflüssigkeit würde es ermöglichen, die Wirkung von potentiellen Neuropharmaka in-vivo mitzuverfolgen.

In dieser Diplomarbeit sollte ein System zur Messung von Substanzen in der interstitiellen Flüssigkeit im zentralen Nervensystem einer Ratte aufgebaut und optimiert werden. Das Messsystem arbeitet nach dem Prinzip der offenen Mikroperfusion (OFM), welches bereits für Haut und Fettgewebe etabliert ist. Eine Adaption des Katheters zur Messung im Gehirn der Ratte musste durchgeführt werden. Um letztlich eine Messung innerhalb der intakten BHS zu ermöglichen, musste der Katheter hinsichtlich des Risikos der Öffnung der BHS optimiert werden.

# Kapitel 2

## Methoden

### 2.1 State Of The Art

In den Neurowissenschaften sind derzeit verschiedene Systeme etabliert, um Messungen im Gehirn durchzuführen. Mit der Technik der cOFM wird eine neue, kontinuierliche und kostensparende Methode eingeführt, die das Spektrum der Methoden zur Messung im Gehirn erweitern soll. Weit verbreitete und etablierte Methoden sind:

- Biopsie
- Bildgebende Techniken
- Intrazerebrale Mikrodialyse
- In-vivo Voltammetrie

Bei der Probengewinnung durch *Biopsie* kann im Gehirn (Indikator-Diffusionstechnik, quantitative Radiographie, Gehirnperfusionstechnik) pro Versuchstier immer nur ein Messpunkt aufgenommen werden. Kontinuierliche, zeitaufgelöste Messungen sind nur mit einer großen Anzahl an Versuchstieren und den damit verbundenen hohen Kosten, sowie ethischen Implikationen möglich. Jeder Datenpunkt ist einem Tier zugeordnet, die statistische



Intervariabilität zwischen den einzelnen Versuchstieren fließt als Fehler in die statistische Auswertung mit ein, was die statistische Aussagekraft der Methode herabsetzt.

*Bildgebende Verfahren* (Abb. 2.1) sind eine nicht invasive Möglichkeit die Durchlässigkeit der BHS zu messen, dazu sind allerdings teure Großgeräte notwendig. PET (Positron Emission Tomographie) wird unter anderem bei der Verifizierung von präklinischen Daten im Menschen eingesetzt, benötigt aber einen Zyklotron in unmittelbarer Nähe zur Herstellung der kurzlebigen Marker-Isotope. MRT (Magnet Resonanz Tomographie) wird zur Untersuchung von neurodegenerativen Krankheiten eingesetzt, jedoch kann damit nur eine geringe Anzahl an Substanzen beobachtet werden. Mit MRS (Magnet Resonanz Spektroskopie) kann eine Vielzahl von Substanzen gemessen werden, Standardgeräte haben aber eine räumliche Auflösung von ca.  $1\text{cm}^3$  und sind damit ungeeignet für den Einsatz im Kleintierbereich.

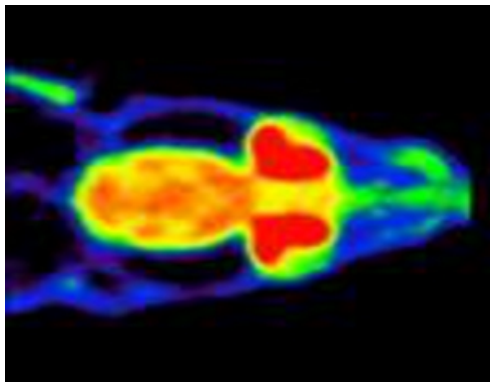
Die *intrazerebrale Mikrodialyse* ist ein minimalinvasives Verfahren mit dem es möglich ist kontinuierliche und zeitaufgelöste Pharmakokinetik- und Pharmakodynamikstudien durchzuführen. Dabei wird eine Membran ins Gehirn implantiert (Abb. 2.2), die von einer Flüssigkeit durchspült wird, wodurch kontinuierlich gemessen werden kann. Auf der einen Seite schützt die Membran die Mikrofluidik vor Verstopfung, auf der anderen Seite werden großmolekulare Substanzen wie Proteine, proteingebundene und lipophile Substanzen sowie Zellen von der Messung ausgeschlossen. Die große Membranoberfläche begünstigt das Anlagern von Substanzen wodurch die Poren der Membran verstopft werden und dadurch auch kleinmolekulare Substanzen nicht mehr ins Perfusat übertreten können. Beim Abheilen des durch die Implantation verursachten Traumas werden Prozesse in Gang gesetzt, die in weiterer Folge zu einem Trauma-Layer führen. Der Trauma-Layer ist eine Schicht bestehend aus verschiedenen, am Heilungsprozess beteiligten, Zellen, Zellresten sowie glialem Narbengewebe, die als zusätzliche Barriere für diffundierende Substanzen fungiert. Diese Limitierung der Methode wurde in der Literatur [5], [13] [12], [15], [14] und in einem White-Paper der FDA [4] kritisch betrachtet.



(a) PET-Scanner



(b) MRT/PET Scanner

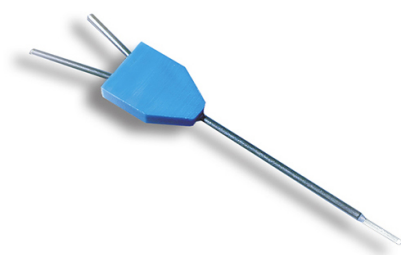


(c) PET-Scan eines Ratten Gehirns

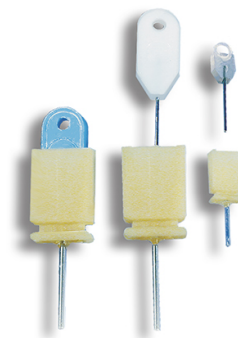


(d) MRT Bild eines Ratten Gehirns

*Abb. 2.1: Bildgebende Verfahren*



(a) CMA 12 Mikro dialyse Katheter



(b) CMA Guide Kanülen

*Abb. 2.2: Mikro dialyse Katheter*

Die *In-vivo Voltammetrie* basiert auf dem Prinzip der elektrochemischen Oxidation *in-vivo*. Man weiß, dass Stoffe bei einer für sie typischen Spannung oxidieren. Hierbei wird ein 3-Elektrodensystem in einen Gehirnbereich implantiert. Durch Anlegen einer Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden kommt es zur Oxidation der Substanz, was in einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Stromes resultiert. Dieser wird mit der dritten Elektrode gemessen. Die Technik ist minimalinvasiv, der Durchmesser der Elektroden beträgt nur  $d = 30\mu m$ , allerdings kann nur eine begrenzte Anzahl von Substanzen gemessen bei begrenzter Selektivität. Veränderungen im Verhalten der Elektrode nach der Implantation führen zu Änderungen bezüglich der Sensitivität, Änderung der Auflösung und eine Verschiebung des Oxidationspotentials.[9][17]

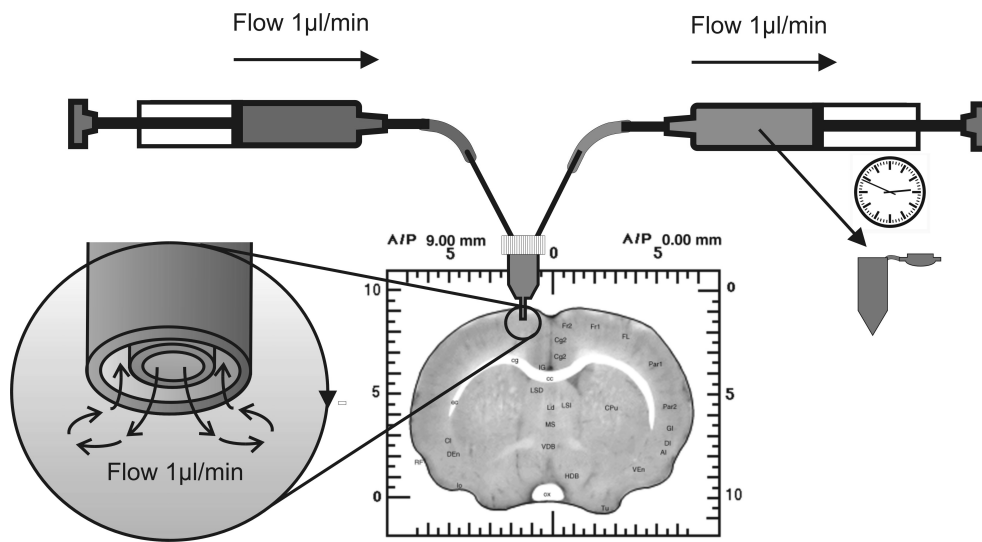
Tabelle 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der oben beschriebenen Methoden.

## 2.2 cOFM - System

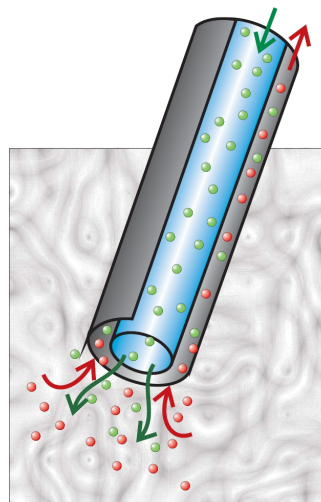
Bei der *OFM - offenen Mikroperfusion* handelt es sich um eine minimalinvasive Methode, zur kontinuierlichen, zeitaufgelösten Messung von Substanzen, ähnlich der MD aber ohne Membran. Die Anwendung im Gehirn wird als *cOFM* (cerebral Open Flow Microperfusion) bezeichnet. Unter Perfusion versteht man das Einbringen einer physiologischen Flüssigkeit, dem so genannten Perfusat, über den Katheter in das Gewebe, die dieses überstreicht und durch den selben Katheter wieder abgesaugt wird (Abb. 2.5). Dabei kommt es zu einem Stoffaustausch, die Substanzen treten aus der interstitiellen Flüssigkeit durch Diffusion und Konvektion in das Perfusat über (Abb. 2.4). Es ist wichtig, dass die Ein- und Ausflussrate gleich sind, damit es zu keiner Flüssigkeitsansammlung (Ödembildung) im Gehirn kommt. Das mit den Analyten angereicherte Perfusat (Sample oder Probe) wird in einem Behältnis (Vial) gesammelt und einer Analyse im Labor zugeführt.

Method	Anwendungen	Limitierungen
Biopsie	Indikator-Diffusionstechnik, quantitative Radiographie, Gehirnperfusionstechnik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ein Messpunkt pro Tier</li> <li>• große Anzahl an Versuchstieren</li> <li>• hohe Kosten</li> <li>• verminderte statistische Aussagekraft</li> </ul>
Bildgebende Verfahren	PET, MRT, MRS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sehr teuer</li> </ul>
Mikrodialyse	intrazerebral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• minimalinvasiv</li> <li>• nicht geeignet für <ul style="list-style-type: none"> <li>– Proteine</li> <li>– proteingebundene Substanzen</li> <li>– lipophile Substanzen</li> </ul> </li> <li>• zeitlich begrenzte Anwendung</li> </ul>
In vivo Voltammetrie	intrazerebral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• wenige Substanzen</li> <li>• Elektrodenunsicherheiten</li> </ul>

**Tabelle 2.1:** State of the Art Methoden im Vergleich



*Abb. 2.3: Funktionsschema der cOFM Messung*



*Abb. 2.4: Substanzen gelangen durch Diffusion und Konvektion in das Perfusat*

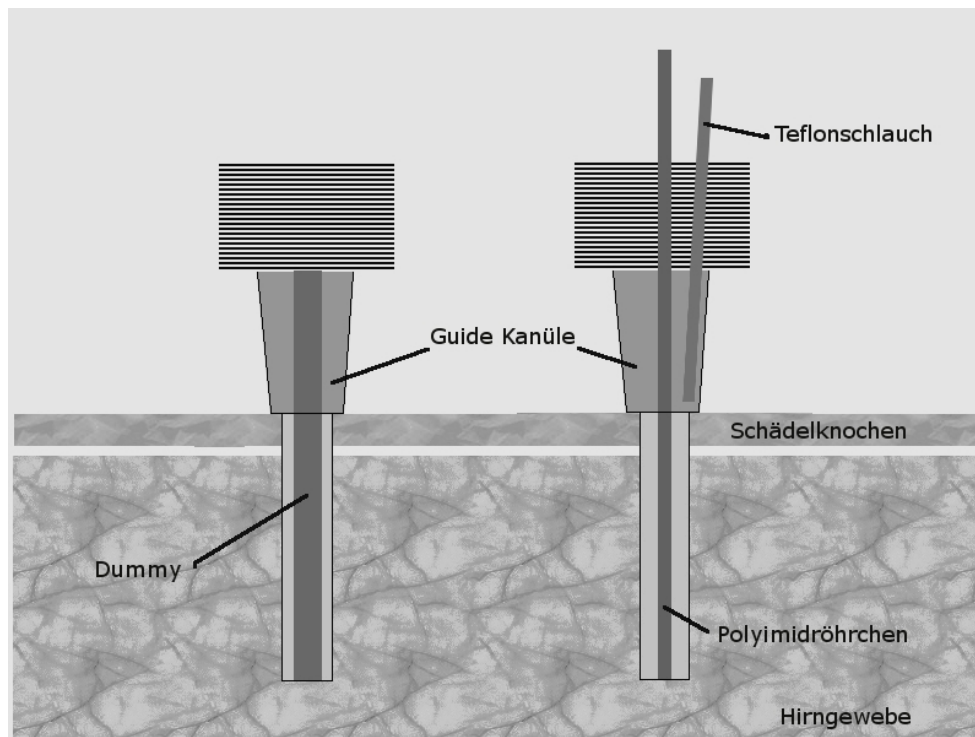


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Bestandteile des cOFM-Katheters

## 2.3 cOFM - Katheter

Der cOFM Katheter besteht aus 2 ineinander liegenden Rohren, Guide-Kanüle und Kathetereinsatz (Abb. 2.3). Über den Kathetereinsatz wird Flüssigkeit in das Hirngewebe eingebracht und über den Raum zwischen Kathetereinsatz und Guide-Kanüle wird das Perfusat vermischt mit der extrazellulären Flüssigkeit wieder abgesaugt. Während der Implantation und der Traumaheilungsphase wird der Kathetereinsatz durch einen Dummy ersetzt der bei der Implantation die nötige mechanische Stabilität gibt und ein Verstopfen der Guide-Kanüle während der Heilungsphase verhindert.

### 2.3.1 Aufbau & Funktion

#### Materialien cOFM-Katheter

##### 1. Rohmaterial

- BD Angiocath<sup>TM</sup>22G

- BD Luer-Lok™
- Polyimid Schlauch  $d_a = 0,4mm$
- PTFE Schlauch  $d_a = 0,7mm$
- Tygon® Schlauch  $d_a = 2,03mm$   $d_i = 0,19mm$

## 2. Hilfsmittel und Werkzeuge

- Bohrmaschine
- 0,5mm Dentalbohrer
- 1mm Dentalbohrer
- Schlauchschneidemaschine
- Laminar Flow
- Ultraschallreiniger
- Folienschweißgerät
- Skalpell
- Diverse Pinzetten
- Pin-Nadel
- Präzissionslineal
- Mikroskop
- Diverse Spritzen und Kanülen
- Seitenschneider
- Diamantfeile
- Folienschweißgerät
- Steripacks

## 3. Chemikalien

- Cyanoacrylat Kleber (Cyanolit)
- UV-Kleber
- Alkohol (2-Propanol)

Der Katheter besteht aus drei Teilen:

- Guide-Kanüle (Abb.2.7)
- Dummy (Abb. 2.7)
- Kathetereinsatz (Abb.2.9)

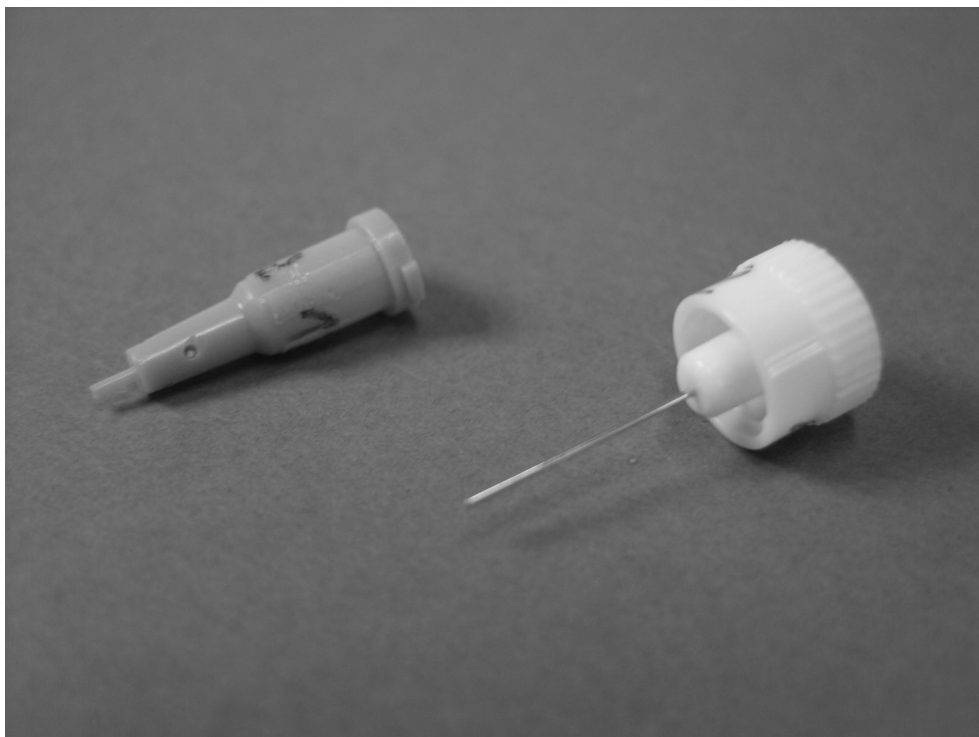
Die *Guide-Kanüle* ist ein modifizierter Venenverweilkatheter der Fa. Becton, Dickinson and Company (BD Angiocath<sup>TM</sup>Venenverweilkatheter 22G Abb. 2.6), dessen flexibler Schlauch aus einem Fluor-Ethylen-Polymer (FEP) besteht. FEP hat sehr gute Gleiteigenschaften, ist chemisch inert und weich. Dadurch ist gewährleistet, dass das Trauma bei der Implantation und die Gewebereaktion nach der Implantation minimiert wird. Die Länge des Katheterschlauchs ist abhängig von der Positionierung des Katheters im Gehirn und wird während der Herstellung der Guide-Kanüle individuell angepasst. Der Katheter verfügt über eine standardisierte Luer-Verbindung. Die Luer-Verbindung ist im klinischen Alltag weit verbreitet und einfach, ohne Werkzeug, zu bedienen. Es kann damit eine dichte Verbindung durch Fingerkraft hergestellt werden. Der *Dummy* ist aus zwei Einzelteilen aufgebaut. Der Kopf ist eine handelsübliche Luer-Kappe der Fa. Becton, Dickinson and Company (BD Luer-Lok<sup>TM</sup>), die mit der Guide-Kanüle dicht verschraubt werden kann. Der Stahlstift wird aus der Setznadel des BD Angiocath<sup>TM</sup>gefertigt. Dadurch ist gesichert, dass Dummy und Guide-Kanüle perfekt zusammen passen. Die Spitze des Dummy wird zu einer Halbkugel gefeilt, um das Verletzungsrisiko, wie es bei einer scharfen Spitze gegeben wäre, beim Wiedereinsetzen nach der Perfusion zu minimieren. Würde der Dummy nicht konzentrisch eingeführt werden, bestünde die Möglichkeit, dass der FEP Schlauch und das umliegende Gewebe durch die Spitze beschädigt wird. Die Länge des Dummy wird entsprechend der Länge der Guide-Kanüle bei der Herstellung angepasst. Der Dummy wird in die Guide-Kanüle eingeschraubt und verbleibt auch nach der Implantation in der Guide Kanüle (Abb. 2.8). Er hat im Wesentlichen zwei Aufgaben: Er soll der Guide Kanüle während der Implantation Stabilität geben und er verhindert, dass während der Heilung des Implantationstraumas Gewebe in das Innenlumen der Guide Kanüle einwächst.

Der *Kathetereinsatz* (Abb. 2.9) ist das Herzstück des Katheters. Durch ihn wird das Perfusat in das Gehirn gepumpt und die Probe (=Perfusat + interstitielle Flüssigkeit) aus dem Gehirn wieder abgesaugt. Der Kathetereinsatz besteht aus fünf Einzelteilen. Eine mit Polytetrafluorethylen (PTFE) beschichtete Polyimidröhre dient als Push-Kanal, ein PTFE-Schlauch als Pull-Kanal. Polyimid ist steif und chemisch inert. Um allerdings sicher zu





*Abb. 2.6: Rohmaterialien für einen cOFM-Katheter*

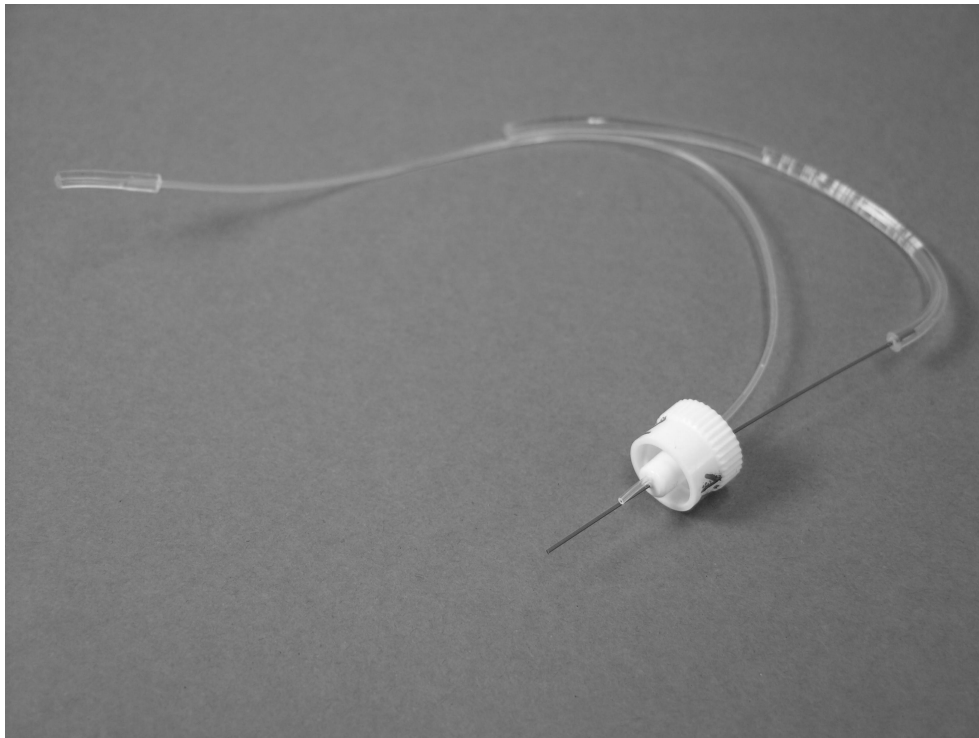


*Abb. 2.7: Guide-Kanüle und Dummy von JR/HEALTH*

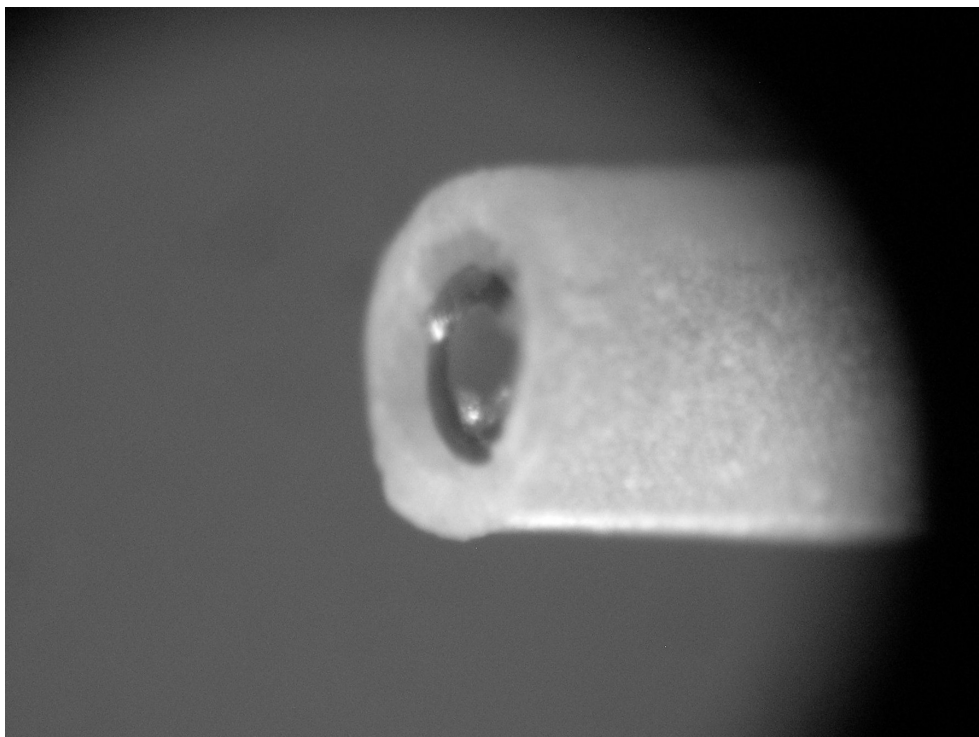


**Abb. 2.8:** Guide-Kanüle und Dummy im zusammengebauten Zustand

gehen, dass es zu keinerlei Adsorptionen kommen kann und somit alle möglichen Analyten gemessen werden können, wurde die Polyimidröhre an ihrer äußeren Oberfläche zusätzlich mit PTFE beschichtet. Die beiden Leitungen sind in eine Luer-Lok<sup>TM</sup>Verschlusskappe mit Cyanoacrylat Kleber eingeklebt. Dadurch wird eine luftdichte, Kupplung mit der Guide-Kanüle hergestellt. Die Länge der Polyimidröhre wird bei der Herstellung an die Länge der Guide-Kanüle angepasst (Abb. 2.10). Der PTFE-Schlauch des pull-Kanals reicht vom Katheter bis zur Spritze, in der die Probe gesammelt wird. Er wird so angebracht, dass die Probe direkt am oberen Ende des FEP-Schlauchs der Guide-Kanüle abgesaugt wird. Das bedeutet also, dass sämtliche Substanzen, die aus dem Gehirn gewonnen werden, ausschließlich mit PTFE/FEP in Berührung kommen. Das Risiko einer Adsorption ist dadurch minimiert. Als Verbindungsstück zwischen der Push/Pull Syringe und Kathetereinsatz dienen Tygon®Schläuche.



*Abb. 2.9: Kathetereinsatz*



*Abb. 2.10: Spitze des Katheters (außen FEP-Schlauch, innen Polyimidröhre)*

### Funktion

Das Perfusat befindet sich in einer  $250\mu\text{l}$  Hamilton® Spritze, welche in einer Spritzenpumpe eingespannt ist. Die Pumpe fördert das Perfusat mit einer konstanten Flussrate von  $1\frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  über die Polyimidröhre in das Gehirn. Der Außendurchmesser der Polyimidröhre beträgt  $d = 0,4\text{mm}$ . Der Innendurchmesser der Guide-Kanüle ist mit  $0,7\text{mm}$  um  $0,3\text{mm}$  im Durchmesser größer. Die Differenz der Flächen ergibt  $\Delta A = 0,26\text{mm}^2$ . Über diese Fläche wird die Probe abgesaugt und über den PTFE-Schlauch in einer  $250\mu\text{l}$  Hamilton® Spritze gesammelt. Diese zweite Spritze befindet sich ebenfalls in einer Spritzenpumpe, welche die Probe mit einer konstanten Flussrate von  $1\frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  absaugt. Durch die Kupplung kann der Kathetereinsatz nach einer Messung wieder entfernt, gereinigt und sterilisiert werden, um zu einem späteren Zeitpunkt im selben Tier, in gleicher Art und Weise, wieder verwendet zu werden.

Bei der Implantation des Katheters findet eine Traumatisierung des Gewebes statt. Dabei werden beim Einbringen durch den Katheter Zellen zerstört wodurch es zu einer Öffnung der BHS kommt. Die BHS besteht zum größten Teil aus Endothelzellen die, verknüpft über Tight-Junctions, dicht aneinander liegen und die kapillaren Blutgefäße auskleiden. Da der Außendurchmesser des Katheters um ein vielfaches größer ist als der mittlere Abstand zwischen den Kapillaren im Gehirn, werden bei der Implantation immer Kapillaren zerstört. Das Problem stellt sich auch beim Ersetzen des Dummy durch den Kathetereinsatz, da das Polyimidröhrchen größer ist als der Kapillarabstand, was zu einer Öffnung der BHS führt, wenn das Polyimidröhrchen an der Spitze des Katheters über die Guide-Kanüle hinausragt.

Im Laufe der Diplomarbeit wurden am Katheter mehrere Verbesserungen hinsichtlich der Traumareduktion und der Optimierung der Funktionalität durchgeführt. Diese wurden in folgenden in-vitro Versuchen evaluiert.

## 2.4 In-vitro

Eine vorhergehende Version des Katheters hatte eine über die Katheterspitze hinausragende Polyimidröhre. Dadurch bestand das Risiko, ein Trauma vor der Messung, beim Einführen des Kathetereinsatzes in die Guide-Kanüle zu verursachen. Um dieses Risiko zu reduzieren, wurde die Polyimidröhre des Kathetereinsatzes auf die Länge der Guide-Kanüle gekürzt. Die Funktionalität und die Auswirkungen auf die Recovery dieser neuen Katheterspitze wurde in in-vitro Versuchen überprüft. Die Recovery ist ein etablierter Vergleichsparameter für Sampling-Methoden. Die Recovery ( $R$ ) ist definiert als:

$$R = \frac{(c_{in} - c_{out})}{(c_{in} - c_{ext})} \quad (2.1)$$

$c_{in}$  Konzentration des Analyten im Perfusat

$c_{out}$  Konzentration des Analyten in der Probe

$c_{ext}$  Konzentration des Analyten im Gewebe

Für diese Versuche wurde Agarose-Gel als Agarose Diffusionsmodell verwendet. Um das optimale Set-up zu finden wurde vorab ein Pilotversuch durchgeführt.

### 2.4.1 Pilotversuch

Es wurden 3 verschiedene Typen von Katheterspitzen (Abb. 2.11) parallel getestet, um einen direkten Vergleich zu erhalten. Abbildung 2.11 (a) zeigt den ursprünglichen Typ (Long-Type), (b) (Medium-Type) und (c) (Short-Type) sind zwei neue Typen, die verglichen werden.

#### Materialien

##### 1. Verwendete Geräte

- Schale (BxLxH 90x170x40)
- Matrix-Platte (Joanneum Research - HEALTH)

- Peristaltikpumpen (Gilson; Miniplus 3; Gilson Inc., USA)
- Tygon Pumpschläuche  $d_i = 0,19\text{mm}$ ,  $d_a = 2,03\text{mm}$ ,  $l = 65\text{cm}$  (9 push, 9 pull)
- 3x3 Guide Kanüle (Joanneum Research - HEALTH)
- 3x3 Dummy (Joanneum Research - HEALTH)
- 3x3 Kathetereinsatz (Joanneum Research - HEALTH)
- Vials (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Cool Packs zur Probenkühlung
- Pipette und Spitzen (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Super GL Glukose Analysegerät (Dr. Müller Gerätebau GmbH)
- Analyse Waage (Sartorius-Acculab ALC 110.4)

## 2. Chemikalien

- Agarose
- Glukose Lösung 40% (Fresenius-Kabi)
- Doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser
- 2-Propanol - Isopropanol (Carl Roth GmbH+Co KG, Deutschland)

### Agarose Diffusionsmodell

Das Agarose Diffusionsmodell war ein Gemisch aus 2% Agarose, 125ml 40%ige Glukose Lösung und 375ml doppelt destilliertem, deionisiertem Wasser. Das Modell hatte eine Glukosekonzentration von 10%. Die Agarose wurde im Glukose-Wasser Gemisch bis zur Siedetemperatur erhitzt, in die Schale gefüllt und zum Erkalten über Nacht bei Zimmertemperatur gelagert. Die mikroskopische Struktur von Agarose-Gel gleicht einem Netzwerk aus verschieden langen Stäben, die sich ungeordnet im Gel verteilen. Diese Stäbe sind Polysacharidketten die sich beim Erkalten vernetzen. Dieses Netzwerk stellt einen Widerstand für die Diffusion der Glukosemoleküle dar. Weitere, die Diffusion beeinflussende, Parameter sind:

- Größe der diffundierenden Moleküle
- Temperatur
- Viskosität

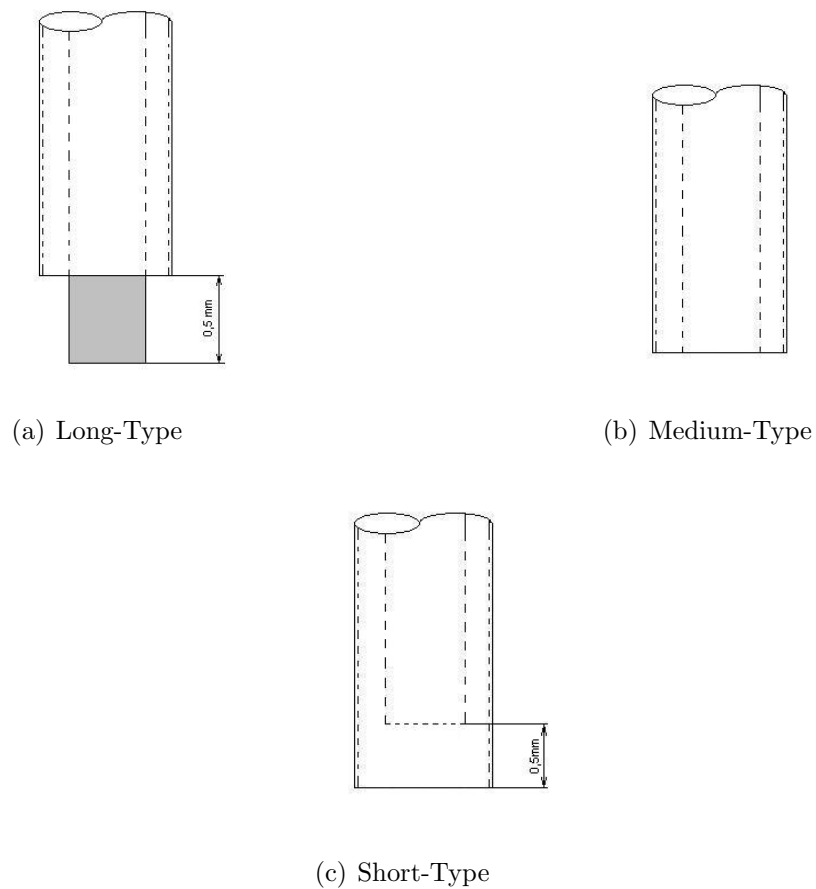
- Konzentrationsgradient
- Zeit
- Maschenweite des Agarose-Gels (Tortuosity)

Es wurde gezeigt [10], dass Glukose auf Grund ihrer Größe in 1,5%igem Agarose-Gel und bei einer Temperatur von 25°C, frei diffundieren kann.

Es sei noch erwähnt, dass Agarose-Gel, so wie alle anderen Gewebemodelle, die tatsächliche Situation in realem Gewebe nur bis zu einem gewissen Grad widerspiegelt. Der Transport in diesem Agarose Diffusionsmodell geschieht ausschließlich passiv. In realem Gewebe hingegen werden Stoffe aktiv und passiv transportiert. Im Verlauf der Messung im Agarose Diffusionsmodell kommt es rund um den Katheter zu einer Verarmung an Analyten (Glukose), sodass die Konzentration annähernd null wird, da ausschließlich passive Transportmechanismen wirken. Es ist daher klar, dass aus den Daten der in-vitro Experimente keine direkten Rückschlüsse auf die Situation im Gehirn gezogen werden können. Die in-vitro Experimente dienen lediglich zum Vergleich verschiedener Design-Varianten miteinander und deren qualitativen Eigenschaften.

### **Katheterspitzenvarianten**

Bei der Implantation des Katheters inklusive Dummy entsteht ein Trauma. Bis zur Abheilung des Traumas und Wiederherstellung der BHS befinden sich die Tiere in speziellen Käfigen. Nach dem Austausch des Dummys durch den Kathetereinsatz ist eine Perfusion möglich. Bei der ersten Design-Variante des cOFM Katheters war der Kathetereinsatz länger als die Guide-Kanüle (Abb. 2.11(a)). Der ursprüngliche Gedanke war, möglichst viel Austauschfläche zu bekommen über die Substanzen bzw. der Analyt ins Perfusat gelangen kann. Beim Einbringen des Kathetereinsatzes besteht das Risiko, dass durch den Überstand ein neues Trauma verursacht und die BHS erneut geöffnet wird. Eine Messung innerhalb intakter BHS ist nicht möglich. Durch Kürzung des Schlauchs des Kathetereinsatzes verringert sich aber die Austauschfläche, was zu einer niedrigen Recovery führt. Je kleiner die

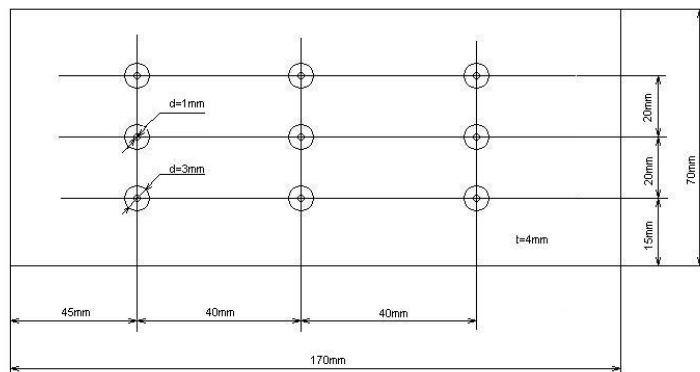


**Abb. 2.11:** Designvariationen des Katheters

Austauschfläche, desto kleiner die Konzentration des Analyten im Perfusat. Der neue Kathetereinsatz (Abb. 2.11(b),(c)) soll das Risiko eines neuen Traumas verhindern, die BHS nicht verletzen und bezüglich der Recovery im Bereich des Vorgängermodells liegen. Der Versuch soll Auskunft darüber geben, ob das neue Design für die oben angeführten Zwecke geeignet war.

Die Katheter wurden in die Matrixplatte (Abb. 2.12) eingeklebt und der Dummy wurde eingeschraubt. Die Matrixplatte ist eine 0,5mm dicke Acrylglasplatte mit 9 Bohrungen, in welchen die Guide-Kanülen mit Cyanoacrylatkleber fixiert werden. Durch die Montage der Katheter auf der Matrixplatte konnten alle 9 Katheter zur gleichen Zeit, in einem definierten Abstand zueinander, platziert werden. Die Katheter wurden zunächst mit destilliertem,





**Abb. 2.12:** Matrixplatte zur Katheterbefestigung

deionisiertem Wasser gefüllt und später perfundiert. Als Perfusat diente ebenfalls destilliertes, deionisiertes Wasser.

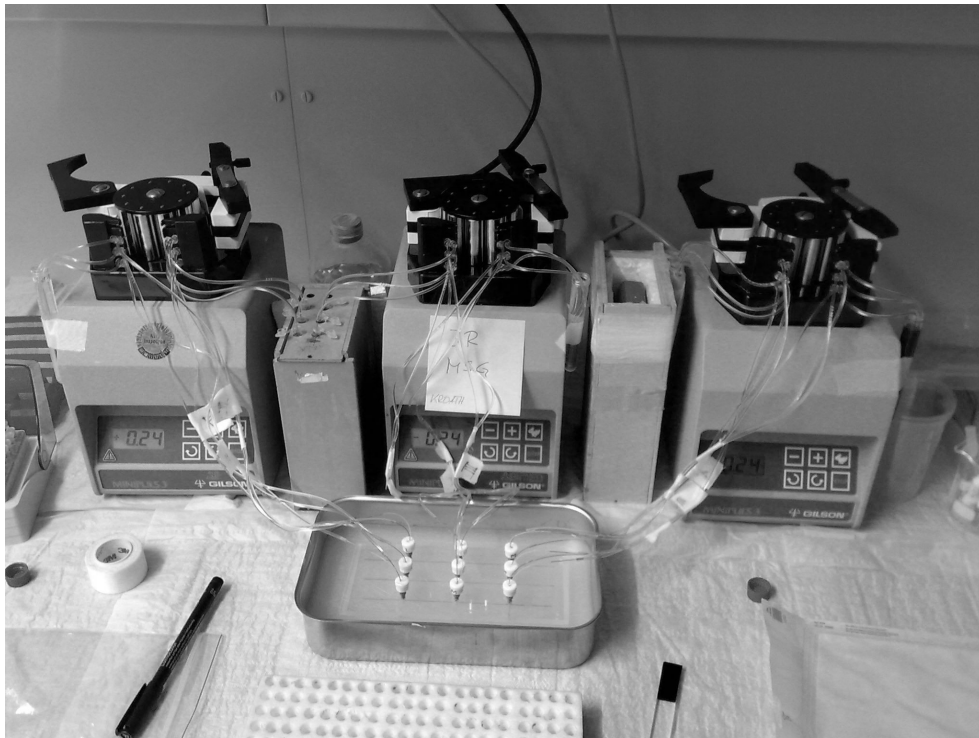
### Messplatzaufbau

Die Versuche fanden am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz statt. Die Messung unmittelbar im Anschluss an die Probengewinnung verhinderte den Abbau der Glukose. Es entfielen die Zwischenlagerung und die dadurch notwendige antibiotische Behandlung der Proben.

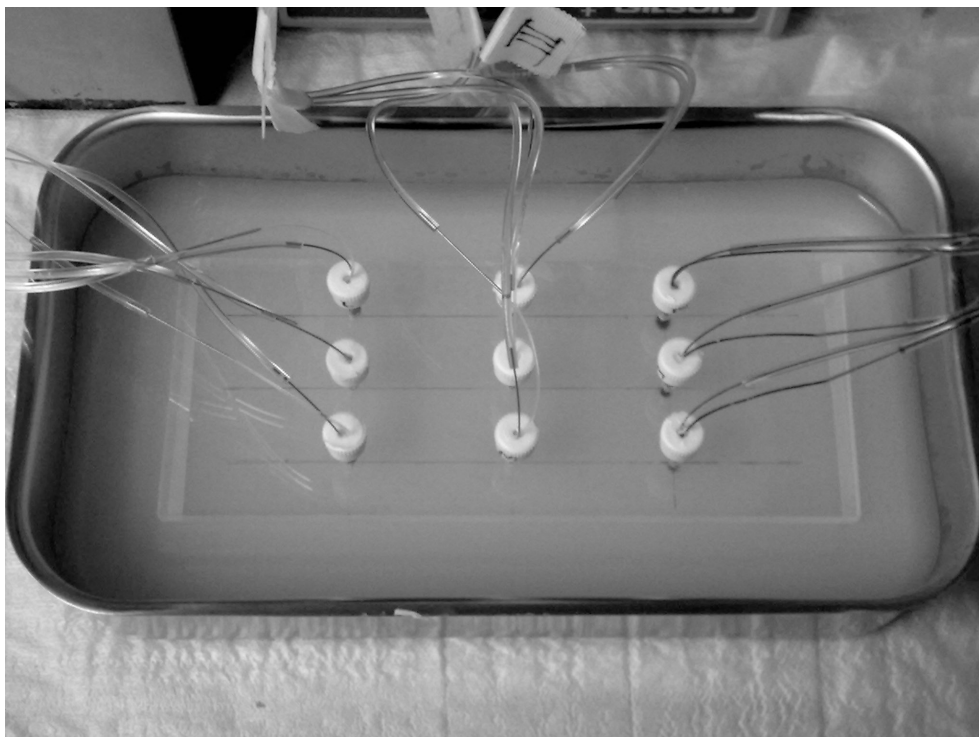
Der Aufbau des Messplatzes ist in Abbildung 2.13 dargestellt.

Im Vordergrund befindet sich die Schale mit den eingesetzten Kathetern (Abb. 2.14).

Die Katheter wurden über Tygon-Schläuche mit dem Perfusat bzw. mit den Vials verbunden. Die Schläuche waren in die Peristaltikpumpen eingespannt. Die Peristaltikpumpen haben je 4 Kanäle in die Pumpschläuche eingespannt werden. Die Drehzahl der Pumpe war entsprechend der SOP (Standard Operating Procedure) auf  $0,21rpm \Rightarrow 1 \frac{\mu l}{min}$  eingestellt. Da die Probenmengen bei einem Sampleintervall von  $30min$  nur  $30\mu l$  betragen und eine Verdunstung der Flüssigkeit bei so geringen Mengen zu einer Verfälschung der Messer-



*Abb. 2.13: Messplatzaufbau des in-vitro Experiments*



*Abb. 2.14: Katheter in Matrixplatte*



**Abb. 2.15:** Glukosemessgerät SuperGL - Analyzator

gebnisse führt, wurden die Vials gekühlt. Eine weitere Maßnahme zur Verzögerung der Verdunstung ist das Verschließen der Vials mit Parafilm. Vor dem Einschrauben der Kathetereinsätze wurden die Schläuche und der Kathetereinsatz mit 2-Propanol gespült und mit Perfusat gefüllt, um eine möglichst geschlossene Wassersäule zu erzeugen. Diese ist Voraussetzung für einen kontinuierlichen Fluss. Ist die Flüssigkeitssäule zum Beispiel durch Lufteinschlüsse unterbrochen, führt das unterschiedliche Verhalten von Luft und Perfusat bei Unterdruck zu einem ungleichförmigen Fluss. Nach dem Füllen wurde das System gestartet. Das Sammeln der Proben begann erst nach einer Einlaufphase von 20min.

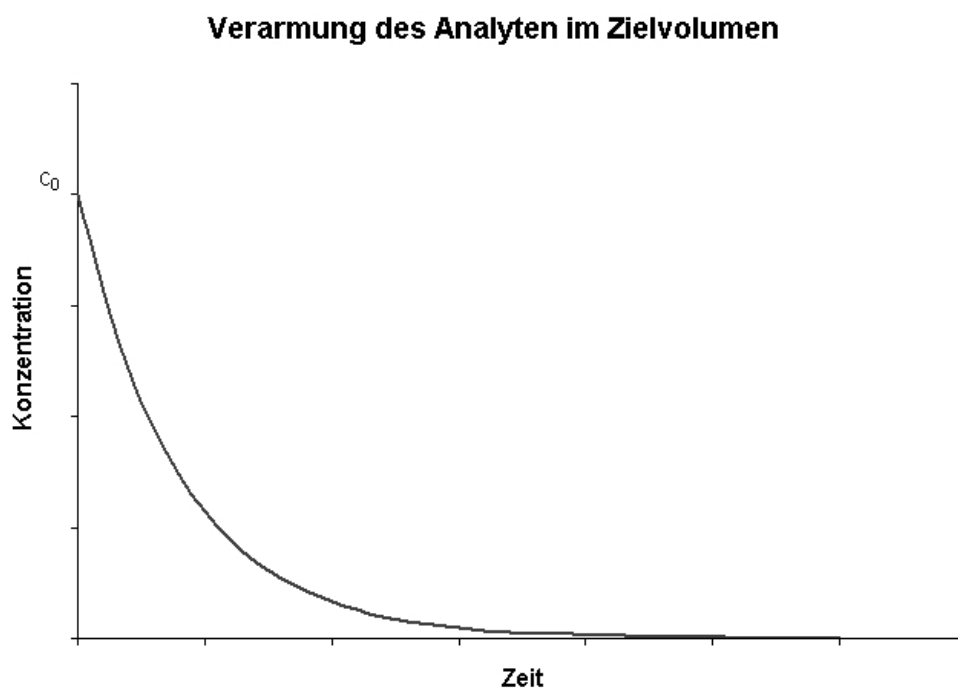
Die Vials wurden nach Ablauf des 30min Intervalls gewogen, um später Rückschlüsse auf die Flussrate zu bekommen. Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte mit dem Glukosemessgerät Super GL Analyzer (Abb. 2.15), das uns freundlicherweise vom Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt wurde. Das Messgerät benötigt mindestens  $20\mu\text{l}$  Probenflüssigkeit, um eine aussagekräftige Messung durchführen zu können. Um eine Kontrolle über die korrekte Funktion des Messgerätes zu erhalten, wurde stündlich eine Kalibrationsmessung mit einer dafür vom Hersteller vorgesehenen Standardlösung durchgeführt. Die gemessenen Glukosekonzentrationen wurden in einem Konzentration-Zeit-Diagramm eingetragen und eine Approximationskurve erstellt. Da in Agarose-Gel nur passive Transportprozesse ablaufen und Glukose nicht aktiv aus der Peripherie nachgeliefert wird, kommt es zu einer Auswaschung

der Glukose um die Katheterspitze. Es handelt sich hier um eine Form von Diffusion in freier Lösung, dessen Lösung im eindimensionalen Fall durch Gleichung 2.2 gegeben ist.

$$c(t) = c_0 \left[ 1 - \operatorname{erf} \left( \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \right] \quad (2.2)$$

Die Modellfunktion in Gleichung 2.3 sollte den durch (2.2) beschriebenen Konzentrationsverlauf näherungsweise wiedergeben (Abb.2.16).

$$c_{glc}(t) = Ae^{-Bt} \quad (2.3)$$



**Abb. 2.16:** Erwarteter Konzentrationsverlauf, beschrieben durch die Modellfunktion (2.3)

Als Maße für die Performance wurden herangezogen:

- Steilheit der Auswaschkurve
- Absolute Glukosekonzentration

Die Steilheit spiegelt die Fähigkeit des Katheters wider, Glukose aus dem Agarose Diffusionsmodell zu entziehen und ist durch den Exponenten der Exponential-Funktion charakterisiert, daher wird der Exponent als ausschlaggebender Marker herangezogen.

Das Experiment endete nach zehn Proben. Die aus dem Pilotversuch gewonnenen Erkenntnisse flossen direkt in die Vorbereitung zum Hauptversuch ein.

## 2.4.2 Hauptversuch

Es wurden 2 verschiedene Typen von Katheterspitzen (Abb. 2.17) parallel getestet, um einen direkten Vergleich zu erhalten. Der vorhergehende Typ (Long-Type) und ein neuer Typ (Medium-Type) wurden verglichen. Die Zielsetzung entsprach der im Pilotversuch (vgl. 2.4.1 auf Seite 17).

### Materialien

#### 1. Verwendete Geräte

- Schale (BxLxH 90x170x40)
- Matrix-Platte (Joanneum Research - HEALTH)
- Peristaltikpumpen (Gilson; Miniplus 3; Gilson Inc., USA)
- Tygon Pumpschläuche  $d_i = 0,19mm$ ;  $d_a = 2,03mm$ ;  $l = 65cm$
- 3x3 Guide Kanüle (Joanneum Research - HEALTH)
- 3x3 Dummy (Joanneum Research - HEALTH)
- 3x3 Kathetereinsatz (Joanneum Research - HEALTH)
- Vials (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Cool Packs zur Probenkühlung
- Pipette und Spitzen (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Super GL Glukose Analysegerät (Dr. Müller Gerätebau GmbH)
- Analyse Waage (Sartorius-Acculab ALC 110.4)

#### 2. Chemikalien

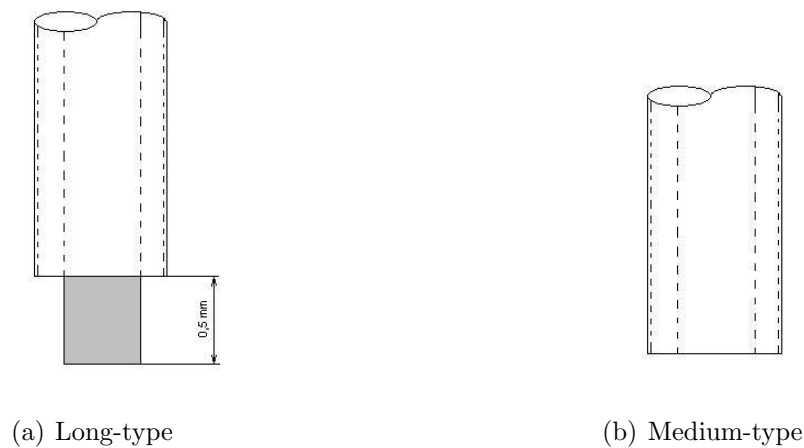
- Agarose
- Glukose Lösung 10% (Fresenius-Kabi; )
- Doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser
- Färbemittel - Tinte (Pelikan)
- 2-Propanol - Isopropanol (Carl Roth GmbH+Co KG, Deutschland)

### Agarose Diffusionsmodell

Das Agarose Diffusionsmodell für den Hauptversuch wurde aufgrund der Ergebnisse aus dem Pilot-Versuch etwas abgeändert. Anstelle der 40%igen Glukoselösung, wurde eine 10%ige Glukoselösung verwendet. Dadurch war die Glukosekonzentration des Gewebemodells auf 2,5% herabgesetzt.

### Katheterspitzenvarianten

Entsprechend den Erkenntnissen aus dem Pilotversuch, wurden im Hauptversuch nur mehr zwei Katheterspitzenvarianten (Abb. 2.17) miteinander verglichen.



**Abb. 2.17:** Im Hauptversuch verwendete Designvariationen des Katheters

### Messplatz

Der Aufbau des Messplatzes entsprach dem Aufbau aus dem Pilotversuch (Abb. 2.13) mit Ausnahme des Pumpen Setups. Die Anpresskraft an den Kanälen wird über Schrauben für jeden Kanal separat eingestellt. Es ist daher nicht möglich für jeden Kanal die exakt gleiche Kraft einzustellen. Da die Anpresskraft der Klemmen am Kanal Auswirkungen auf die Flussrate hat, wurden je zwei Pumpschläuche, Inflow und Outflow Zweig, in einem Kanal gemeinsam eingespannt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Anpresskraft, und in

Folge die Flussrate, für beide Richtungen gleich groß war. Außer den oben genannten Änderungen am Pumpen Setup wurde auch die Drehzahl der Pumpen um  $0,3rpm$  erhöht. Um die Lufteinschlüsse am Beginn des Pilotversuchs zu vermeiden, wurden die Guide-Kanülen vor dem Einbringen der Kathetereinsätze mit Perfusat gefüllt. Die Probengewinnung begann erst als keine Lufteinschlüsse mehr in den Pumpschläuchen waren. Die gemessenen Werte wurden wieder in ein Konzentration-Zeit-Diagramm eingetragen und approximiert.

## 2.5 In-vivo

Die cOFM wird in der präklinischen Forschung eingesetzt. Der Katheter wird ins Gehirn des Versuchstieres implantiert. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde die Katheterspitze und somit die Austauschfläche im linken Frontallappen positioniert.

### 2.5.1 Hirnperfusat

Wichtige Parameter sind die Zusammensetzung und Temperatur des Perfusats. Dieses ist den physiologischen Bedingungen des Gehirns bezüglich Substanzen, Ionenkonzentration, Osmolarität und pH angepasst. Für spezielle Versuchsdesigns kann z. B. durch Variation der Konzentration eines Bestandteils der Konzentrationsgradient, der die Richtung der Diffusion vorgibt, geändert werden. In Tabelle 2.2 ist eine angepasste Zusammensetzung des Hirnperfusats gelistet.

Substanz	Menge [mM]
NaCl	123
MgCl	0,4
CaCl <sub>2</sub>	0,7
KCl	4,3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21
Glukose	2

*Tabelle 2.2: Zusammensetzung des künstlichen Hirnperfusats*

Nicht nur die Zusammensetzung hat Auswirkungen auf die Gewebereaktion, auch eine zu

niedrige Temperatur des Perfusats kann ungewünschte Reaktionen Hirngewebes hervorrufen und damit die Messergebnisse beeinflussen. In der Literatur [8] wird daher empfohlen das Perfusat bei Körpertemperatur zu verwenden.

## 2.5.2 Implantation

Die Implantation der Guide-Kanüle inklusive Dummy erfolgte unter sterilen Bedingungen im Kleintier-OP des Instituts für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz. Die Medikation wurde von Dr<sup>in</sup> Iris Wiederstein zusammengestellt. Sämtliche Eingriffe wurden von entsprechend geschultem Personal durchgeführt.

### Verwendete Materialien bei der Implantation

#### 1. Instrumente

- Anästhesie Einheit (Rothacher und Partner; Isoflurane Vaporizer; Bern, Schweiz)
- Analyse Waage (Sartorius-Acculab ALC 110.4)
- Homeothermisches System mit Heizmatte (TSE Systems; TempControl II)
- Stereotaktischer Rahmen (David Kopf Instruments)
- OP-Lampe (Kaiser; macrospot 1500)
- Bohrmaschine (Proxxon; NG2/S, FBS 12/E)
- Dental-Bohrer (Fine Science Tool Microdrill Burr d=0,9mm)
- Knochenschrauben (Fine Science Tool Bone Screw 1,17x4,7)
- Schraubenzieher
- Dental-Zement (HERAEUS ICEM Self Adhesive)
- UV-Lampe
- Guide Kanüle (Joanneum Research - HEALTH)
- Dummy (Joanneum Research - HEALTH)
- Instrumentenschale
- Diverse Spritzen und Kanülen
- Skalpell inkl. Klängen Nr. 10
- Diverse Pinzetten
- Sterile Tupfer



- Einmal Tupfer

## 2. Medikamente und Chemikalien

- Volatiles Anästhetikum (Isofluran)
- Schmerzmittel (Fentanyl)
- Midazolam (Benzodiazepin - Sedativ)
- Domitor (Medetomidin - Sedativ)
- Anexate (Flumazenil - Antagonist zu Benzodiazepin)
- Antisedan (Atipamezol - Antagonist zu Medetomidin)
- Schmerzmittel (Carprofen - Rimadyl)
- Antibiotikum (Cefotaxim - Claforan)
- NaCl-Lösung
- Wasserstoffperoxid 5%  $H_2O_2$
- Augensalbe
- Ethanol (ETOH)

## Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere waren männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 300g – 350g. Die Tiere wurden von Harlan Laboratories Inc. bezogen und bis zu ihrer Verwendung am Institut für biomedizinische Forschung in der allgemeinen Tierhaltung gehalten. Die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Standardfutter.

## Arbeitsablauf

Während der Implantation waren die Tiere narkotisiert. Die initiale Narkose wurde mit Isofluran, einem volatilen Anästhetikum, gemischt mit Sauerstoff eingeleitet. In der Anästhesie Einheit (Abb. 2.18) wird das Narkotikum verdampft und mit Sauerstoff gemischt. Das Gemisch bestand aus 1,5% Isofluran bei  $0,4 \frac{l}{min} O_2$ . Dazu wurden die Tiere in Inkubationsboxen gesetzt. Diese Boxen besitzen einen Einlass für das Gasgemisch, sowie einen Auslass mit Aktivkohlefilter für die Ausatemluft und das überschüssige Gas. Um Stress für die

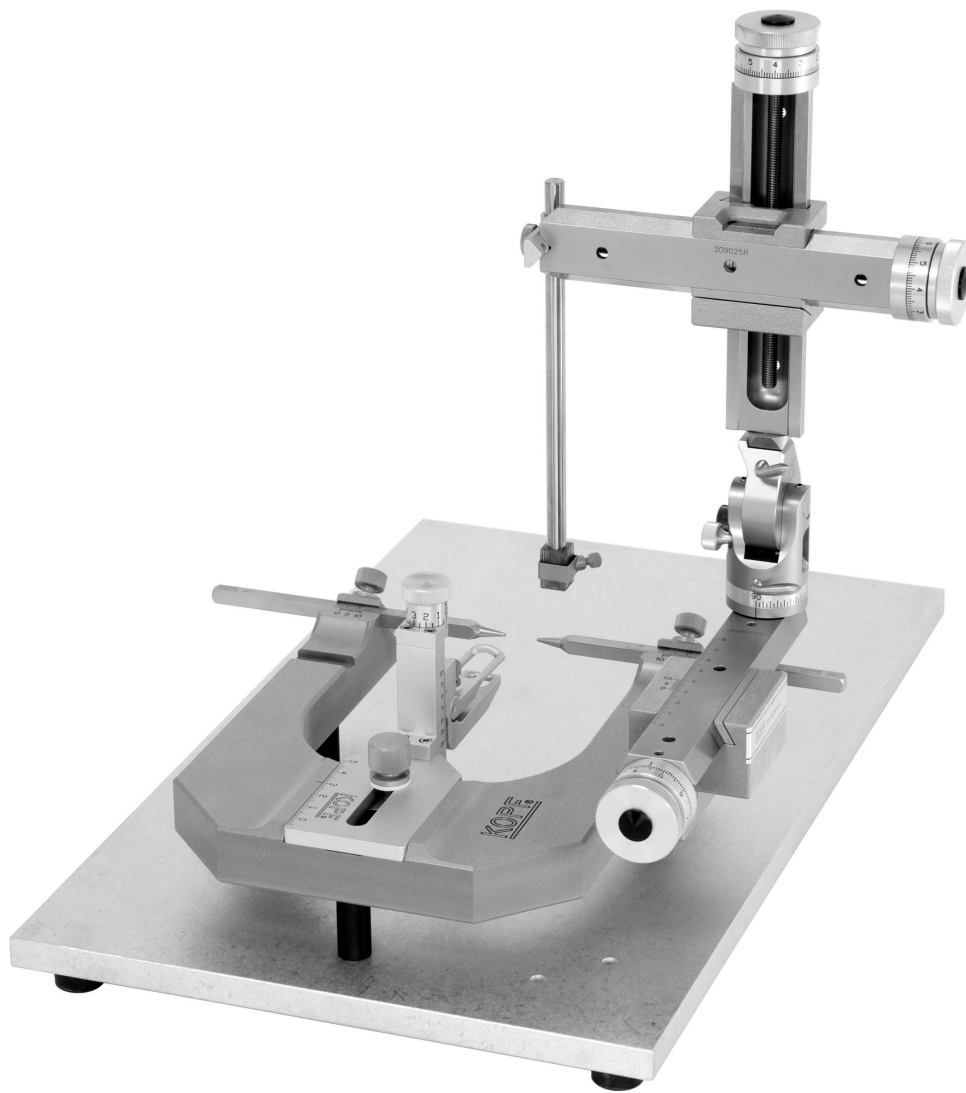


**Abb. 2.18:** Anästhesie Einheit - Isoflurane Vaporizer

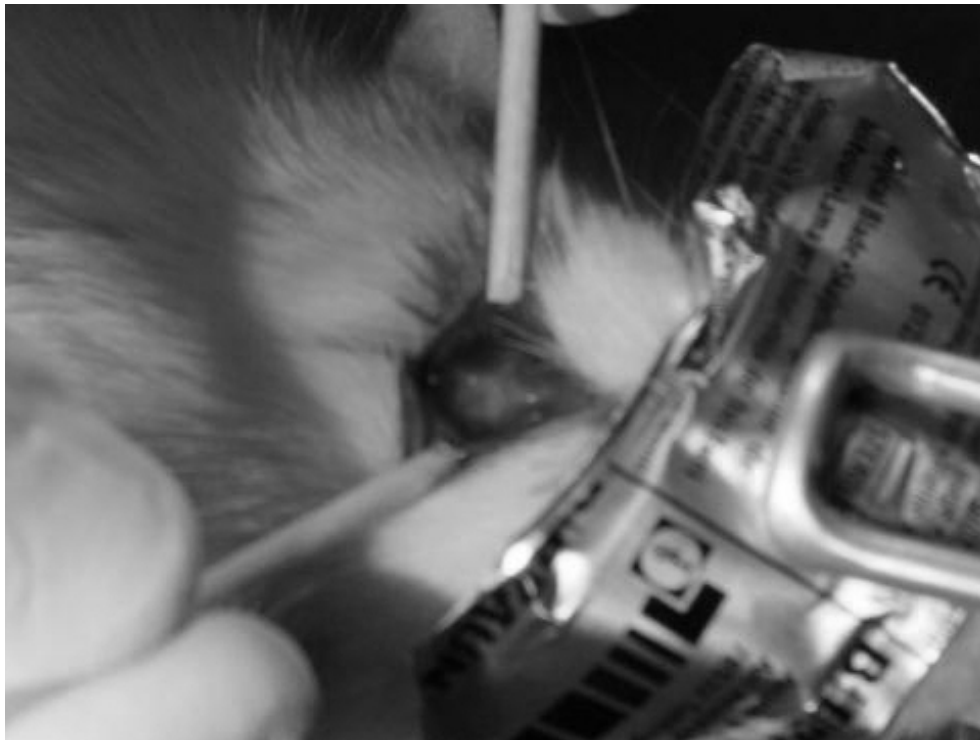
Tiere zu vermeiden wurde wurde die Hauptnarkose unter Initialnarkose eingeleitet. Die dafür verwendete Injektionslösung (FMD - Fentanyl, Midazolam, Domitor) wurde vorab hergestellt. Die Dosis betrug 0,15ml/100g Körpergewicht. Die Injektion wurde subcutan (s.c.) verabreicht. Die Wirkung trat nach etwa 5 min ein und hielt cirka 90min an. Der Kopf der Tiere wurde im stereotaktischen Rahmen (Abb. 2.19) fixiert. Die Fixierung im stereotaktischen Rahmen ermöglicht ein präzises Navigieren. Des weiteren bietet der stereotaktische Rahmen die Möglichkeit zur Befestigung einer Halterung, in welche Werkzeuge und Spritzen eingespannt werden. Die Fixierung des Schädels erfolgte durch sogenannte *ear bars*. Diese haben eine abgerundete, kegelförmige Spitze, die in den Gehörgang der Ratte eindringt und den Schädel am Meatus acusticus externus fixiert.

Die Bohrerspitze wurde über dem Bregma positioniert und als der Ausgangspunkt für die Navigation genutzt.

In Abbildung 2.20 ist das Bregma als helles Kreuz zu erkennen. Abbildung 2.21 zeigt die Positionierung der Bohrerspitze auf dem Bregma.



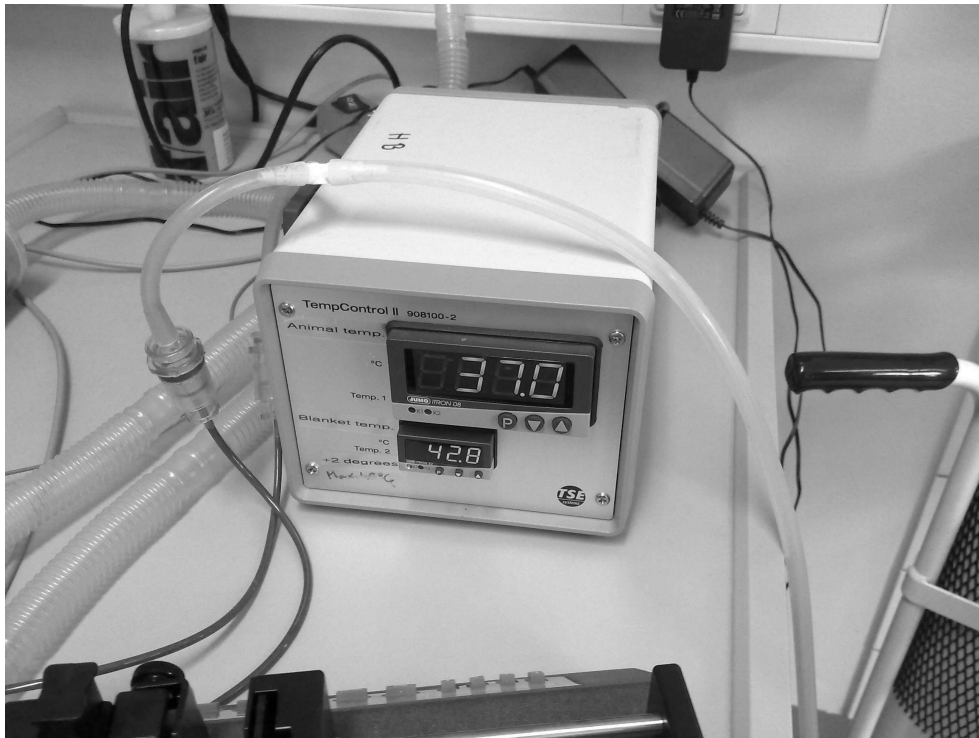
*Abb. 2.19: Stereotaktischer Rahmen für Ratten - David Kopf Instruments*



*Abb. 2.20: Bregma am Rattenschädel*



*Abb. 2.21: Zentrieren der Bohrerspitze*

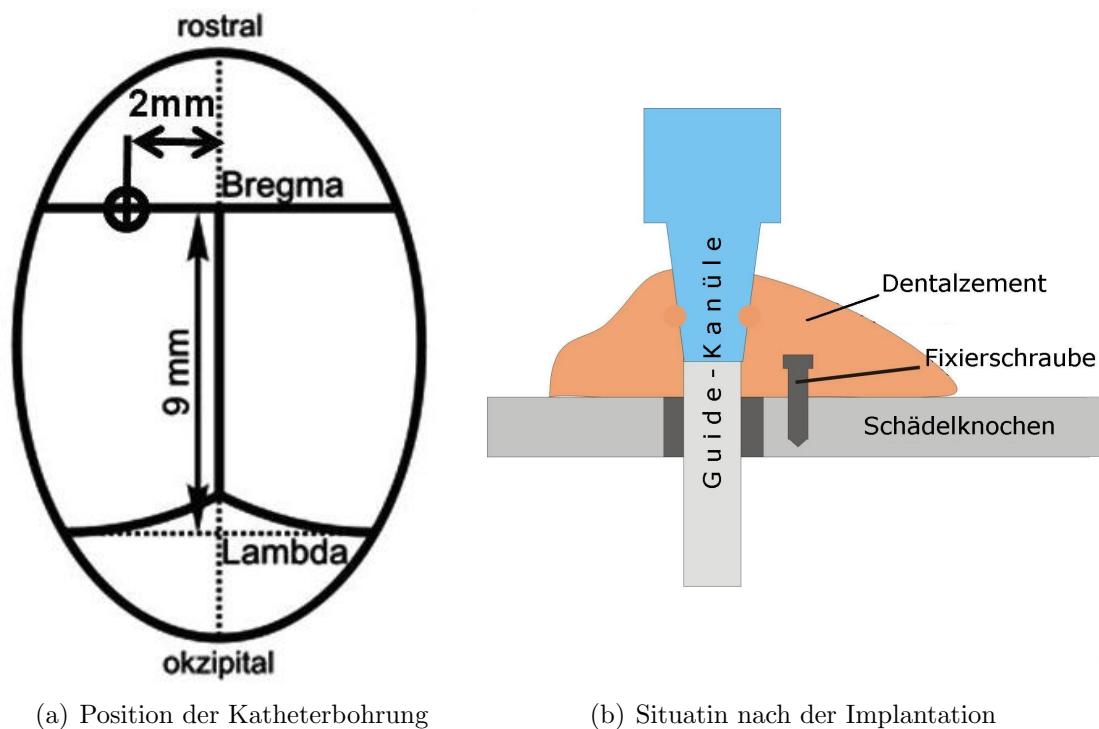


*Abb. 2.22: Temperaturregler des homeothermischen Systems*

Das Tier war mit einem homeothermischen System (Abb. 2.22) verbunden. Ein homeothermisches System besteht aus:

- Homeothermischer Regler (meist ein PID-Regler)
- Rektalsonde zur Bestimmung der Körpertemperatur
- Heizmatte

Dieses misst über die Rektalsonde die Körperkerntemperatur des Tieres und regelt die Heizmattentemperatur so, dass sowohl eine Hypothermie als auch eine Hyperthermie vermieden werden. Eine Hypothermie führt zu nicht physiologischen Zuständen im gesamten Körper. Bei einem Absinken der Körperkerntemperatur kommt es zu einer Unterversorgung der peripheren Regionen, in weiterer Folge zu Herzrhythmusstörungen und endet mit dem Tod des Tieres. Dieser Vorgang kann innerhalb weniger Minuten ablaufen, da die Tiere ein durchschnittliches Körpergewicht von ca. 350g haben und somit über wenig Reserven verfügen.



(a) Position der Katheterbohrung

(b) Situation nach der Implantation

**Abb. 2.23:** Schematische Darstellungen

Die Augen der Tiere wurden mit künstlicher Tränenflüssigkeit benetzt, da während der Narkose der natürliche Lidschluss nicht gegeben ist. Um ein Erblinden der Tiere durch die leuchtintensive OP-Beleuchtung zu vermeiden, wurden die Augen bedeckt. Da die Tiere Albinos sind, ist ihre Lichtempfindlichkeit erhöht.

Nach dem Hautschnitt und dem Freilegen des Schädelknochens wurde das Bregma fixiert, und mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens präzise navigiert. Die Katheterbohrung wurde an der festgelegten Stelle (Abb. 2.23(a)) gebohrt. Dabei darf die Dura Mater nicht verletzt werden. Die Dura Mater umgibt als äußerste Schicht das gesamte zentrale Nervensystem. In der Dura Mater befindet sich der Sinus Sagittalis Superior, ein erweitertes venöses Blutgefäß. Eine Verletzung des Sinus Sagittalis Superior hat den Tod des Tiere zur Folge. Nach der Katheterbohrung wurden noch zwei Bohrungen für die Fixierschrauben (Abb. 2.24) gebohrt.

Vor dem Einbringen der Guide-Kanüle (Abb.2.7) wird die Dura Mater mit Hilfe einer Injektionskanüle punktiert, um das Eindringen des Katheter zu ermöglichen bzw. zu erleichtern.



*Abb. 2.24: Fixierschrauben am Schädel*

Da die Dura Mater eine feste Konsistenz hat und der Dummy des cOFM-Katheters stumpf ist, wird beim Einbringen der Guide-Kanüle die Dura Mater nicht durchstoßen. Es würde zu einer großräumigen Läsion des darunter liegenden Cortex durch Quetschung kommen, wodurch es in diesem Bereich zu einem veränderten lokalen Blutfluss, einem veränderten lokalen Glukosestoffwechsel sowie zu einer erweiterten Schädigung des Hirngewebes im darunter liegenden Kortex kommen würde [1] [7]. Die Veränderung dieser Parameter beeinflussen nachfolgende Messungen, da die Eindringtiefe der Katheterspitze nur gering ist und somit das Areal, in dem gemessen wird, nahe an der Oberfläche liegt.

Die Tiefe der Katheterspitze wurde über den Mikromanipulator des stereotaxischen Rahmens festgelegt. Als Ausgangspunkt diente die Dura Mater. Die Guide-Kanülenspitze wurde bis zur Dura Mater eingeführt (Abb. 2.25). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die Katheterspitze  $2\text{mm}$  unter die Dura Mater eingeführt. Nach dem Einbringen der Guide-Kanüle wurden der Katheter und die Befestigungsschrauben mit Dentalzement verbunden (Abb. 2.23(b)). Die Aushärtung erfolgte mit Hilfe einer UV-

Punktlichtquelle (Abb. 2.26).



*Abb. 2.25: Positionieren der Guide-Kanüle mit Dummy*

Nach dem Eingriff wurde die relaxierende (Domitor) und die hypnotische (Midazolam) Komponente der Narkose antagonisiert. Post operativ wurden die Tiere mit einem Antibiotikum (Cefotaxim) und mit einem Schmerzmittel (Rimadyl) behandelt. Das Antibiotikum (Cefotaxim) wurde auf Grund seiner guten Eigenschaften beim Übertritt über die BHS ausgewählt, um vor allem Bakterien im Gehirn zu bekämpfen.

### 2.5.3 Ionic Reference

#### In-Vivo Recovery

Zur Bestimmung der Recovery von Kathetern in-vivo gibt es in der Literatur [3][12][18] unterschiedliche Ansätze. Man unterscheidet folgende Methoden:

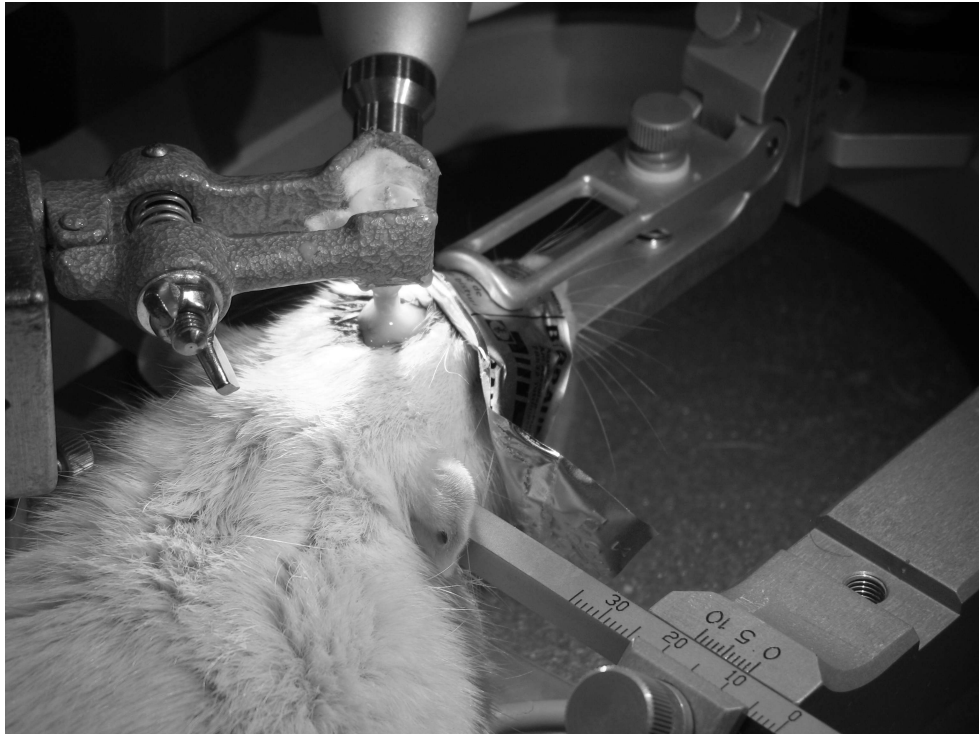
- Variation der Flussrate



- No-Net-Flux
- Dynamic-No-Net-Flux
- Retrodialyse
- Bestimmung mittels endogener Referenzsubstanz

Ziel des Experiments war es die Recovery des cOFM Katheters für Natrium-Ionen ( $\text{Na}^+$ ) in-vivo zu ermitteln. Die Konzentration von  $\text{Na}^+$  im Gehirn wird vom Organismus konstant gehalten. Daher ist  $\text{Na}^+$  ein *state-of-the-art* Parameter, um die Austauschcharakteristik von Messsystemen zu bestimmen. Die  $\text{Na}^+$  Konzentration wurde im Anschluss mittels Flammenphotometrie bestimmt. Die analytischen Messungen wurden von Joanneum Research / HEALTH durchgeführt.

Die Berechnung der Recovery erfolgte nach Gleichung 2.1. Die dazu notwendige Konzentration von  $\text{Na}^+$  ( $c_{ext}$ ) im Gehirn wurde der Literatur entnommen.



**Abb. 2.26:** Aushärten des Dentalzements mit UV-Licht

## Perfusion

Dazu wird der Dummy aus der Guide-Kanüle entfernt und der Kathetereinsatz eingebracht. Der Kathetereinsatz besteht aus zwei dünnen Rohren unterschiedlicher Länge und unterschiedlichen Durchmessers (Abb. 2.9). Die beiden Rohre werden mit je einer der Push- bzw. Pull-Pumpe verbunden. Eine Pumpe infundiert das Perfusat (Push), die zweite Pumpe saugt (Pull) die Probe wieder heraus. Als Pumpen werden Spritzenpumpen verwendet. Die so gewonnenen Proben können mit diversen analytischen Methoden gemessen werden.

## Materialien

### 1. Instrumente

- Anästhesie Einheit (Rothbacher und Partner; Isoflurane Vaporizer; Bern, Schweiz)
- Analyse Waage (Sartorius-Acculab ALC 110.4)
- Homeothermisches System mit Heizmatte (TSE Systems; TempControl II)
- Instrumentenschale
- Diverse Spritzen und Kanülen
- Skalpell inkl. Klingen Nr. 10
- Nadelhalter
- Diverse Pinzetten
- Sterile Tupfer
- Einmal Tupfer
- Kathetereinsatz (Joanneum Research - HEALTH)
- Spritzenpumpe ( WPI; Aladdin2-220; Berlin; Deutschland)
- Peristaltikpumpe (Gilson; Miniplus 3; Gilson Inc., USA)
- Proben Spritze (HAMILTON; 1725RN 250ul SYR GASTIGHT®; Bonaduz, Schweiz)
- Vials (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Infrarot Wärmelampe

### 2. Medikamente und Chemikalien

- Volatiles Anästhetikum (Isofluran)
- Antibiotikum (Cefotaxim - Claforan)

- NaCl-Lösung
- Künstliche Tränenflüssigkeit
- Alkohol (2-Propanol)
- Perfusat (Deionisiertes, doppelt destilliertes Wasser + 5% Glukose)

### **Versuchstiere**

In die hierfür verwendeten Tiere wurde die Guide-Kanüle inklusive Dummy implantiert. Die Tiere hatten eine Erholungsphase von mindestens 11 Tagen. Diese ist notwendig, damit das bei der Implantation entstandene Trauma abheilt. Dadurch sind wieder annähernd physiologische Verhältnisse im Gehirn gewährleistet.

### **Pumpen**

In den hier beschriebenen Experimenten wurden sowohl Spritzenpumpen als auch Peristaltikpumpen (Abb. 2.28) verwendet. Es zeigte sich, dass Spritzenpumpen, im Falle der Hirnperfusion, mehrere Vorteile gegenüber den Peristaltikpumpen haben. Die Genauigkeit der hier verwendeten Spritzenpumpen (Abb. 2.27) ist ausschließlich vom Antrieb und der Fertigungstoleranz der Spritze abhängig. Diese Parameter ändern sich während der Messung nicht. Bei korrekter Konfiguration der Pumpen wird eine konstante Flussrate sowohl bei Inflow als auch bei Outflow über die gesamte Messdauer erreicht.

Die Flussrate von Peristaltikpumpen hängt von folgenden Parametern ab:

- verwendeter Pumpschlauch (Material und Innendurchmesser)
- Anpresskraft der Kanalklemme
- Drehzahl

Der Fluss bei Peristaltikpumpen ist nicht über die ganze Messdauer konstant, wie dies bei den Spritzenpumpen der Fall ist. Der Grund dafür liegt im Pumpprinzip. Bei Peristaltikpumpen werden kleine Flüssigkeitspakete durch Abklemmen des Pumpschlauchs voran



**Abb. 2.27:** Programmierbare Spritzenpumpe Aladdin 2000

gedrückt. Die Größe der Flüssigkeitspakete ist abhängig vom Anpressdruck des Pumpkopfes und den Eigenschaften des Pumpschlauchs. Das periodische Abklemmen des Pumpschlauchs führt zu einer Ermüdung des Schlauchmaterials und einem Verlust der Elastizität, der Schlauch beginnt sich zu verformen. Dadurch ändert sich die Schlauchgeometrie und das Volumen der Flüssigkeitspakete, was bedeutet, dass sich bei gleich bleibender Drehzahl die Flussrate ändert. Dadurch kommt es zu Differenzen zwischen hinein gepumptem Volumen  $V_{in}$  und heraus gesaugtem Volumen  $V_{out}$ . Dies wirkt sich vor allem in empfindlichen und kleinen Zielgebieten, wie dem Gehirn einer Ratte, sehr negativ aus. Wird zu viel hinein gepumpt, steigt der Hirndruck, was einen nicht physiologischen Zustand darstellt und bis zum Tod des Tieres führen kann. Umgekehrt kann es bei größerem abgesaugtem Volumen zu Verstopfungen durch angesaugtes Gewebe kommen. Dadurch wird der Outflow zur Gänze blockiert und ein Spülen des Systems mit reinem Perfusat ist notwendig.

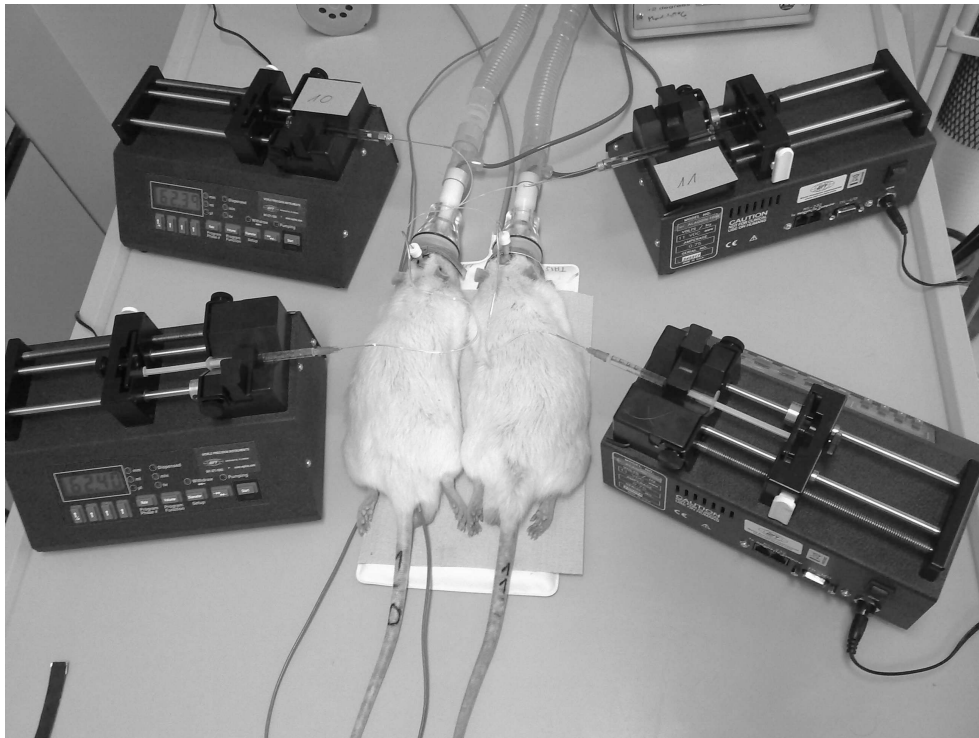


*Abb. 2.28: Gilson Miniplus 3 Peristaltikpumpe*

### **Aufbau des Messplatzes und vorbereitende Arbeiten**

Der Messplatzaufbau ist in Abbildung 2.29 dargestellt. Pro Versuchstier wurden zwei Spritzenpumpen benötigt. Eine Pumpe arbeitete im Push-Betrieb, das heißt, mit ihr wurde das Perfusat in Richtung Tier gedrückt. Das Perfusat befand sich hierbei in einer handelsüblichen Spritze mit einem Fassungsvermögen von  $1\text{ml}$ . Die Verbindung zum Katheter wurde über eine modifizierte 26G Kanüle hergestellt. Der Tygon®-Verbindungsschlauch zwischen Spritze und Katheter wurde auf die Kanüle aufgesteckt. Um zu verhindern, dass die Kanüle in die Wand des Tygon®-Schlachs eindringt, wurde die Spitze der Kanüle abgerundet. Die Dichtheit der Verbindung ist dadurch gegeben, dass der Innendurchmesser des Schlauchs kleiner ist als der Außendurchmesser der Kanüle, ähnlich einer Presspassung im Maschinenbau.

Die zweite Pumpe arbeitete im Pull-Betrieb, das heißt sie saugte die Probe aus dem Katheter heraus. Die Probe wurde in einer  $250\mu\text{l}$  HAMILTON GASTIGHT®-Spritze gesammelt.



*Abb. 2.29: Messplatzaufbau mit 2 Tieren*

Es ist besonders darauf zu achten, dass der Pfad von Schlauchanfang im Katheter bis zum Schlauchende in der Spritze vollständig mit Perfusat gefüllt ist. Dadurch wird ein annähernd lineares Saugen ermöglicht und jedes Volumenelement des Perfusats kommt über die gleiche Zeitspanne mit dem Gewebe in Kontakt. Bei Gaseinschlüssen auf der Pull-Seite ist die Flüssigkeitssäule unterbrochen, wodurch es durch die vergleichsweise hohe Kompressibilität des Gases, gegenüber der Flüssigkeit, zu einer Verzögerung des Outflows kommt. Dadurch sind die Volumenelemente nicht mehr über die gleiche Zeitspanne mit dem Gewebe in Kontakt und die zeitliche Auflösung der Messung geht wegen stark unterschiedlicher Konzentrationen pro Volumenelement verloren.

Die Konfiguration der Pumpen musste vor dem Einbringen des Kathetereinsatzes erfolgt sein. Die korrekten Parameter können den Tabellen 2.3 und 2.4 entnommen werden.

Durchmesser: 4,65mm  
 Flussrate:  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$   
 Pumprichtung: Vorwärts

Durchmesser: 2,3mm  
 Flussrate:  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$   
 Pumprichtung: Rückwärts

**Tabelle 2.3:** Pumpenkonfiguration Push-Pumpe

**Tabelle 2.4:** Pumpenkonfiguration Pull-Pumpe

Nach einer initialen Narkose mit 5% Isofluran bei  $1,5 \frac{\text{l}}{\text{min}} \text{O}_2$ , wurden die Tiere auf einer, vom Untergrund isolierten (z. B. mit Styropor), Heizmatte platziert und über eine Rektalsonde mit dem homeothermischen System verbunden, um eine Hypothermie zu verhindern. Für die dauerhafte Narkose während der Messung, wurden die Tiere über eine Narkosemaske mit der Narkoseeinheit verbunden. Die Dosis der Dauernarkose ist bedeutend niedriger als jene der initialen Narkose, da die Tiere während der Messung nur in einen leichten Schlafzustand versetzt werden, um zum Einen die Auswirkungen der Narkose auf das Messergebnis zu minimieren und zum Anderen die Tiere durch die leichte Narkose weniger zu belasten. Um Gaseinschlüsse beim Einbringen des Kathetereinsatzes zu verhindern, musste die Guide-Kanüle nach dem Entfernen des Dummys mit Perfusat gefüllt werden. Nach Einbringung des Kathetereinsatzes wurden die Pumpen gestartet und die Perfusion begann.

### Probengewinnung und Probenhandling

Der Zeitplan zur Probengewinnung ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Die erste Probe wurde nach 70 min entnommen und jede weitere in 40 min Intervallen. Im ersten Intervall waren 30 min Einlaufphase inkludiert. Die während dieser Zeit gewonnene Probe wurde verworfen. Beim Wechsel der Flussrate von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  auf  $0,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  gab es eine weitere Einlaufphase von 30min, auch diese Probe wurde verworfen. Ein Intervall hatte die Länge von 40 min bei einer Flussrate von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ . Die Samplingdauer bei halber Flussrate musste verdoppelt werden ( $t = 80\text{min}$ ), um ein, für die Analyse, ausreichendes Probenvolumen von ca.  $40\mu\text{l}$  zu erhalten.

Nach Ablauf eines Intervalls wurden die Pumpen zunächst gestoppt. Um die Flüssigkeitssäule aufrecht zu erhalten, wurde die Saugleitung am Tygon®-Verbinder unter Ver-

Probennummer	Zeipunkt [min]	Flussrate [ $\frac{\mu l}{min}$ ]
Einlaufphase	0	1
0	70	1
1	110	1
2	150	1
3	190	1
4	230	1
Einlaufphase	260	0,5
5	340	0,5
6	420	0,5

**Tabelle 2.5:** Übersicht über Proben und Flussraten

wendung des Nadelhalters abgeklemmt. Erst nach dem Abklemmen durfte die Verbindung mit der Spritze getrennt werden. Die Probe wurde aus der Spritze mit den Proben in ein zuvor gewogenes und markiertes Eppendorf Vial entleert. Dieser Vorgang muss innerhalb eines kurzen Zeitraums (z. B.  $t \leq 30s$ ) erfolgen. Danach wurde die Verbindung zwischen Katheter und Pumpe wieder hergestellt und die Pumpe in gestartet. Um eine kontinuierliche Kontrolle der Probenmenge und daher auch der Flussrate zu ermöglichen, wurde das Vollgewicht des Vials im Anschluss ermittelt. Die Dichte  $\rho_{Fluid}$  der Probe wurde mit  $1 \frac{g}{ml}$  angenommen.

Die Probenmenge ergibt sich wie folgt:

$$V_{Probe} = \frac{m_{voll} - m_{leer}}{\rho_{Fluid}} \quad (2.4)$$

Anhand der Probenmenge und der Zeitspanne T, in der die Probe genommen wurde, kann der durchschnittliche Fluss berechnet werden.

$$\bar{\Phi} = \frac{V_{Probe}}{T} \quad (2.5)$$

Bei Abweichungen vom vorgegebenen Fluss wurden Korrekturen an der Pumpenkonfiguration vorgenommen.

Im Anschluss wurden die Proben gefroren und zur Analyse ins Labor gebracht.



### **Nachfolgende Arbeiten und Versuchstierbetreuung**

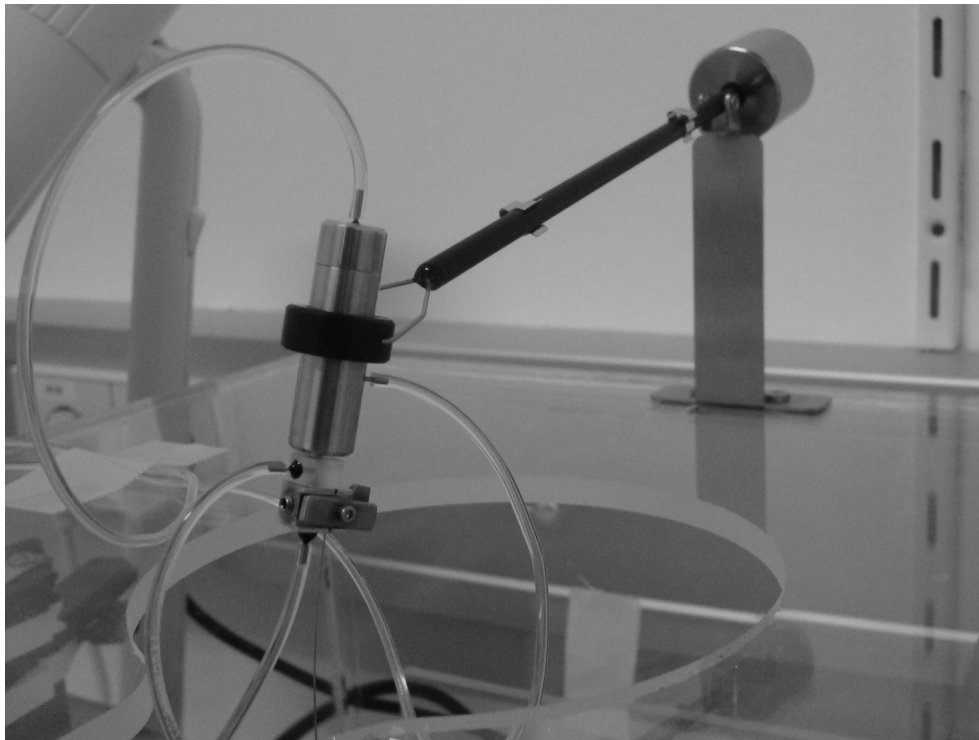
Nach Beendigung der Probengewinnung wurden die Kathetereinsätze durch die Dummy ersetzt. Da die Kathetereinsätze eventuell wieder verwendet wurden, mussten diese mit Isopropanol gespült und in Isopropanol eingelagert werden. Die Tiere wurden an den drei darauf folgenden Tagen nach jedem Eingriff (=Probengewinnung) mit Antibiotika (Cefotaxim) behandelt.

#### **2.5.4 Messung in wachen Tieren**

Die Messung von Hirnsubstanzen in wachen, sich frei bewegenden Tieren ist vor allem in der neurowissenschaftlichen Grundlagen- und Verhaltensforschung von Interesse. Prinzipiell ist es auch mit der cOFM möglich in wachen Tieren zu messen. Aufgrund der thematischen Relevanz stehen diese Versuche am Ende des Kapitels, wurden jedoch zu Beginn der Diplomarbeit durchgeführt, weshalb Katheter mit der Katheterspitzenvariante L-Type (siehe Abb. 2.11 (a) auf Seite 20) und Peristaltikpumpen zum Einsatz kamen.

#### **Aufbau des Systems**

Um den Tieren die Möglichkeit zu geben sich innerhalb ihres Käfigs frei bewegen zu können, ohne dabei die Funktion des Systems zu beeinträchtigen (durch z. B. abgekoppelte oder durchgebissene Schläuche), wurde ein Swivel an einem Konterarm (Abb. 2.30) in den Flusspfad eingebaut. Beide Teile wurden von der Firma Instech Laboratories Inc. bezogen. Das *Swivel* ist eine drehbare Verbindung, welche es den Schlauchleitungen ermöglicht sich frei zu drehen, wenn sich das Tier im Käfig bewegt. Da die zum Drehen des Swivel notwendige Kraft nicht über die Schläuche auf dieses übertragen werden konnte, wurde ein Führungsdraht zwischen Schädel und Swivel eingesetzt. Die Aufnahme für den Draht am Schädel des Tieres wurde während der Implantation mit Dentalzement angebracht (Abb. 2.31). Um chemische Reaktionen zwischen Swivel und Messsubstanzen zu minimieren, war das hier verwendete Swivel zusätzlich an den Innenwänden des Flüssigkeitspfades mit Quarz beschichtet. Die übrigen Bewegungen, neben der Drehbewegung, wurden durch den Kon-



*Abb. 2.30: Swivel mit Konterarm*

terarm und die Swivelaufhängung ausgeglichen. Dadurch ist es dem Tier nicht möglich die Pumpschläuche zu beschädigen oder sich mit den Schläuchen zu verletzen. Durch allgemeinen Aufbau des Messplatzes (Abb. 2.32) war eine Länge von 2m Tygon®Schlauch für die Zu- bzw. Ableitung notwendig.

### **Einbringen des Kathetereinsatzes**

Um die Arbeit zu erleichtern wurden die Tiere vor dem Einschrauben des Kathetereinsatzes mit einem volatilen Narkotikum (Isofluran) leicht narkotisiert. Um eine geschlossene Wassersäule zu erreichen, wurde der Flüssigkeitspfad und die Guide-Kanüle vor Beginn der Messung mit Perfusat gefüllt. Der Kathetereinsatz wurde eingebracht und der Swivel wurde in den Halter am Konterarm eingesetzt.



*Abb. 2.31: Implantat für die Messung am wachen Tier (Neben Katheter: Aufnahme für Führungsdraht)*

### **Messung in wachen Tieren**

Bei diesem Experiment wurden Peristaltikpumpen verwendet. Die Proben wurden dabei direkt in Vials gesammelt. Da im Laufe der Messung stets die Gefahr einer Verstopfung besteht, mussten die Schläuche in regelmäßigen Abständen von 10min auf Luftblasen oder Thromben überprüft werden. Plötzlich auftretende Luftblasen sind ein Indiz für eine Verstopfung des Flüssigkeitspfades, denn durch den steigenden Unterdruck lösen sich Gase aus der Flüssigkeit. In diesem Fall wurde das System mit Perfusat gespült, indem der Outflow Zweig mit maximaler Flussrate durchflutet wurde. Der Spülvorgang zur Beseitigung der Verstopfung wurde am narkotisierten Tier durchgeführt, da dabei der Kathetereinsatz aus der Guide-Kanüle entnommen werden musste. Wenn eine Spülung während eines Proben-Intervalls notwendig war, musste die Probe dieses Intervalls verworfen und im Anschluss eine Einlaufphase gestartet werden. Die Probe der Einlaufphase musste ebenfalls verworfen werden, da es zu einer starken Verdünnung der Analytkonzentration durch Perfusat



*Abb. 2.32: System zur Messung an wachen, sich frei bewegendem Tieren*

im Schlauch kam und daher die Werte nicht mehr repräsentativ waren. Erst nach der Einlaufphase kann wieder ein Proben-Intervall gestartet werden.

### **Nachbehandlung der Versuchstiere**

Vor dem Austausch des Kathetereinsatzes durch den Dummy wurden die Tiere wieder mit Isofluran narkotisiert. Der Kathetereinsatz wurde zunächst mit 2-Propanol und danach mit destilliertem Wasser in beide Richtungen gespült. Um ein Anwachsen von Bakterien an der Katheteroberfläche zu Verhindern, wurden die Kathetereinsätze bis zum nächsten Einsatz in 2-Propanol gelagert. Die Tiere erhielten nach jeder Messung Schmerzmittel (Rimadyl) und Antibiotikum (Cefotaxim) an den folgenden 3 Tagen.

An jedem Tier wurden 3 Messungen durchgeführt. Nach Beendigung dieser Messreihe wurden die Tiere durch intrakardiale Perfusion getötet und das Gehirn entnommen.

# Kapitel 3

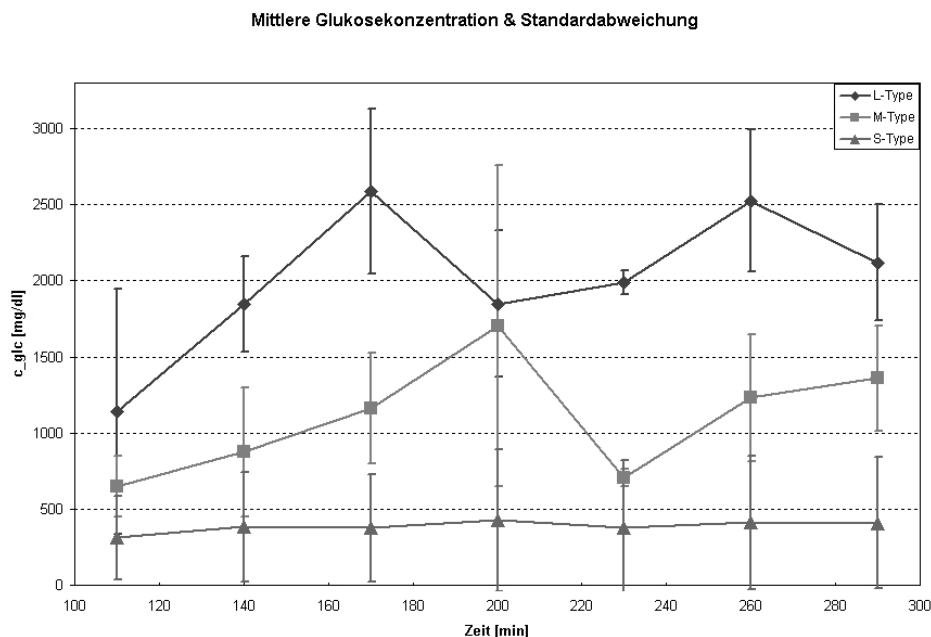
## Ergebnisse

### 3.1 In-Vitro

#### 3.1.1 Pilot-Versuch

Wie in Abschnitt 2.4.1 auf Seite 17 wurde beim Pilotversuch die Auswaschkurve von Glukose im Agarose Diffusionsmodell gemessen. Die in Abbildung 3.1 dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Katheterspitzen Varianten über 3 Katheter gemittelt. Aufgrund der hohen Glukosekonzentration (ca.  $2\frac{g}{dl}$ ) im Agarose Diffusionsmodell wurde die obere Grenze des Messbereichs des Glukose Analysegeräts teilweise überschritten. Die tatsächlichen Konzentrationen wurden anhand einer Verdünnungsreihe berechnet. Man erkennt, dass die Katheterspitzenvariante S-Type unter den übrigen Werten liegt. Da das Austauschverhalten bei dieser Variante zu schwach war, wurde sie vom Hauptversuch ausgeschlossen. Die beiden anderen Varianten (L-Type, M-Type; Abb. 2.17) wurden im Hauptversuch noch einmal mit einander verglichen.

Die Flussrate (Abb. 3.3) wurde über die Gewichtsmethode bestimmt (Gleichung 2.5 auf Seite 44). Der niedrige Wert zu Beginn des Experiments ergibt sich aufgrund von Luftblasen in den Tygon®Schläuchen und den Lufteinschlüssen in den Guide-Kanülen. Daher wurde im Hauptversuch darauf geachtet, dass die Guide-Kanülen vor dem Einbringen des



**Abb. 3.1:** Mittlere Glukosekonzentration aus dem Pilot Versuch

Kathetereinsatzes mit Perfusat gefüllt waren. Die Outflowrate gemessen über die Gewichte der Vials lag durchgehend unter dem erwarteten Wert von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ . Wie bereits in 2.5.3 auf Seite 39 erwähnt, können mehrere Faktoren für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Im Hauptversuch wurde dies durch Erhöhung der Pumpendrehzahl korrigiert.

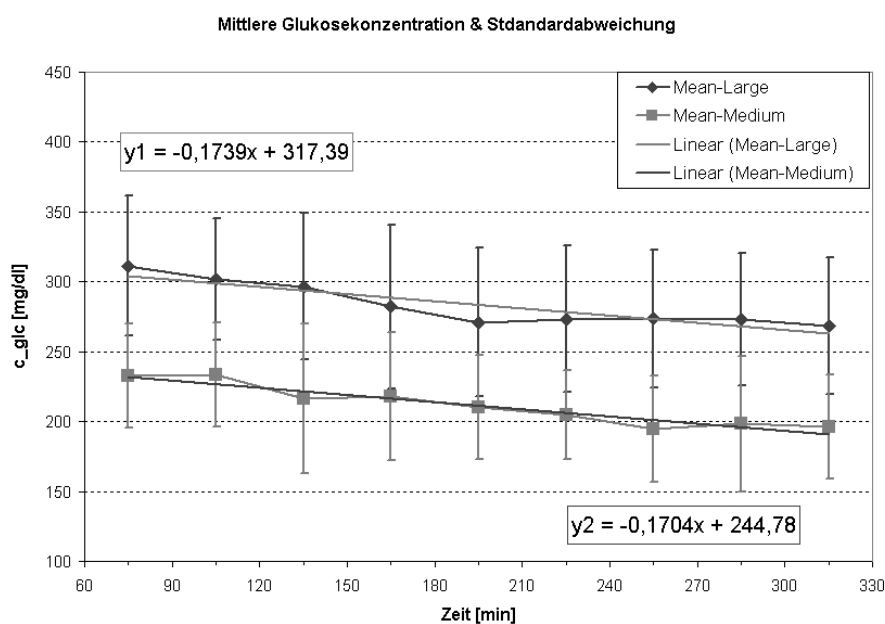
### 3.1.2 Hauptversuch

Anstelle des erwarteten exponentiellen Verlaufs (Gleichung 2.3 auf Seite 24), zeigte sich ein annähernd linearer Verlauf der Konzentrationskurve. Da die erste Probe in der Einlaufphase aus den Ergebnissen ausgeschlossen wurde, kann die Ursache der annähernden Linearität nicht festgestellt werden. Entweder ergibt sich der annähernd lineare Verlauf durch den relativ hohen Agarose Anteil im Agarose Diffusionsmodell von 2% (vgl. Elektrophorese: ca. 1% Agarose), wodurch die Diffusion sehr langsam vor sich geht, oder die Aufzeichnung des Konzentrationsverlaufs begann erst nach dem steilen Abfall zu Beginn der Exponentialfunktion. Da sich ein annähernd linearer Verlauf zeigte wurde eine neue

Approximationsfunktion verwendet:

$$y = B \cdot x + A \quad (3.1)$$

Das Ergebnis der Aproximation mit (3.1) ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Gleichung  $y_1$  beschreibt die Aproximationsfunktion der L-typ,  $y_2$  jene der M-typ Katheterspitzen Variante. Die zeitliche Abnahme der Glukosekonzentration ist bei beiden Katheterspitzentypen annähernd gleich. Die Steilheit der Auswaschung, die ein Maß für die Performance der Katheterspitzenvariante war, ist durch den Parameter  $B$  in Gleichung 3.1 gegeben. Für die Katheterspitzenvariante L-Type ist dies  $B_1 = -0,1739 \frac{mg}{dl \cdot min}$  und für die Variante M-Type  $B_2 = -0,1704 \frac{mg}{dl \cdot min}$ .

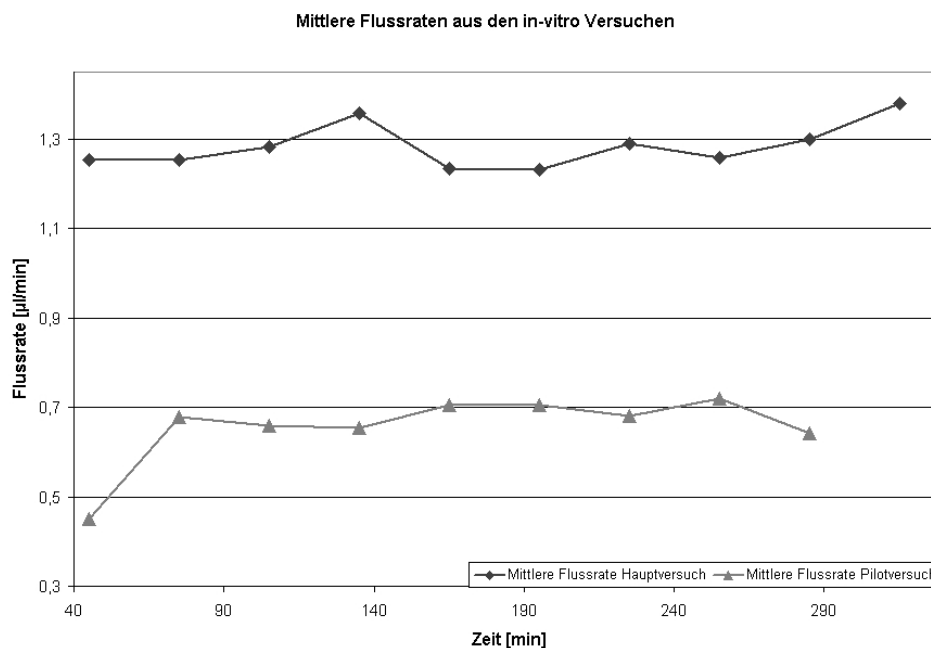


**Abb. 3.2:** Mittlere Glukosekonzentration aus dem Hauptversuch

Das zweite Performancemaß war die absolute Glukosekonzentration, die durch den Parameter  $A$  in Gleichung 3.1 beschrieben wird. Diese waren für die Katheterspitzenvariante L-Type  $A_1 = 317,39 \frac{mg}{dl}$  und für die Variante M-Type  $A_2 = 244,78 \frac{mg}{dl}$ . Die absoluten Konzentrationen zeigen, dass der Katheter des L-Typs wie erwartet netto mehr Glukose abtransportieren kann. Der Katheter des M-Typs hatte netto um 30% weniger Glukose ge-



messen, hat aber den Vorteil, dass das Hirngewebe beim Einsetzen des Kathetereinsatzes nicht beschädigt wird. Die Beschädigung des Hirngewebes hat zur Folge, dass die Messung nicht mehr in annähernd physiologischer Situation stattfindet und daher die Messergebnisse weniger aussagekräftig sind.



**Abb. 3.3:** Mittlere Flussraten aus den in-vitro Versuchen

Die Flussrate (Abb. 3.3) war im Mittel  $1,28 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ . Da der Zusammenhang zwischen Pumpendrehzahl und tatsächlicher Flussrate nicht linear ist, muss nach jeder Probe eine Flussratenkalibration in-situ erfolgen.

## 3.2 In-Vivo

### 3.2.1 Ionic Reference

Die Recovery für  $\text{Na}^+$  Ionen (Abb. 3.4) lag um 30% bei einer Flussrate von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ . Bei einer Flussrate von  $0,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  stieg die Recovery auf 45% an. Da das Perfusat länger mit dem umgebenden Gewebe in direktem Kontakt steht, diffundieren mehr Ionen in das Perfusat und

die  $\text{Na}^+$  Ionenkonzentration in der Probe steigt an. Die gemessenen Konzentrationswerte wurden über 8 Tiere gemittelt und in Relation zur physiologischen  $\text{Na}^+$  Ionenkonzentration im extrazellulären Raum im Gehirn ( $c_{ext} = 140 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) gesetzt. Es wurde ein deionisiertes Perfusat verwendet, d. h. es waren keinerlei Ionen im Perfusat ( $c_{in} = 0$ ). Eingesetzt in (2.1) ergibt sich daraus die Recovery.

$$R_{[\%]} = \frac{c_{out}}{c_{ext}} \cdot 100 \quad \text{mit } c_{in} = 0 \quad (3.2)$$

Um die Stabilität der Recovery über längere Zeit zu zeigen, wurde mit 2 Tieren ein Langzeitversuch über 3 Wochen durchgeführt. Wie sich zeigte (Abb. 3.5) blieb die Recovery über 3 Wochen auf dem gleichen Niveau von 30%. Es ergaben sich keine Einschränkungen durch die wiederholte Perfusion über einen längeren Zeitraum.

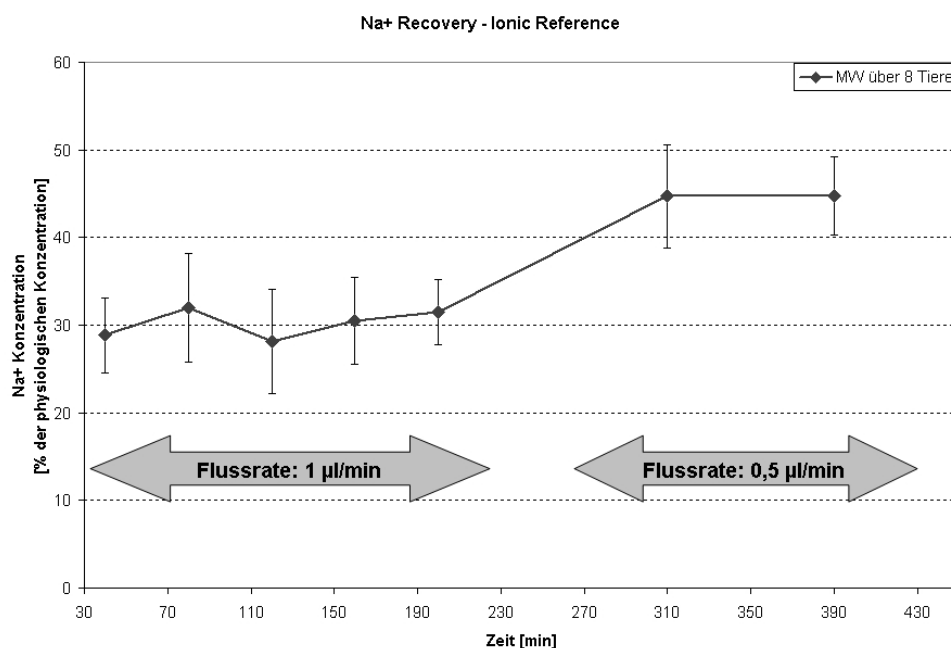


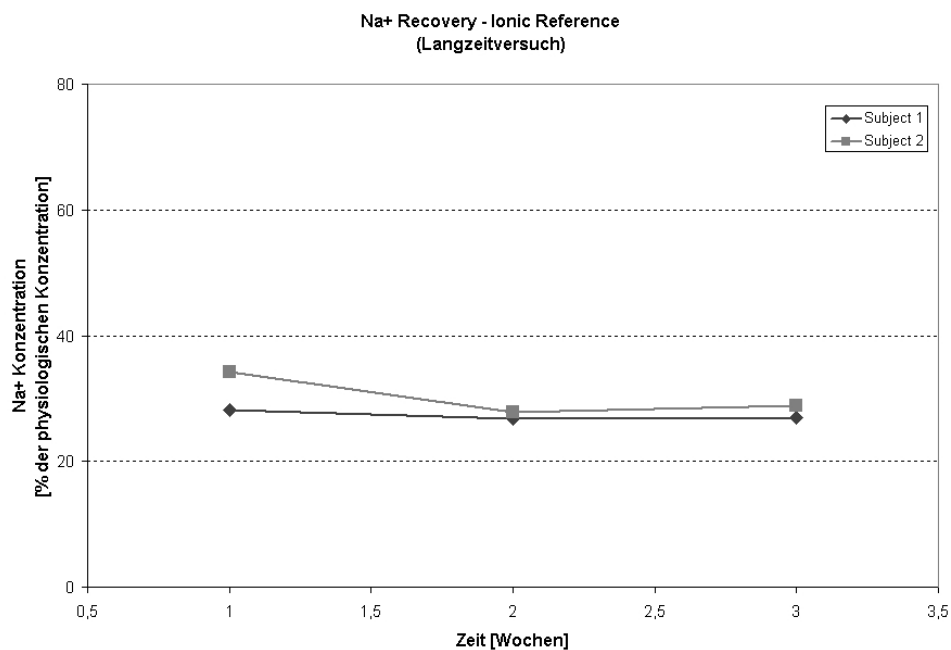
Abb. 3.4: In-vivo Recovery für  $\text{Na}^+$  Ionen

### 3.2.2 Messung in wachen Tieren

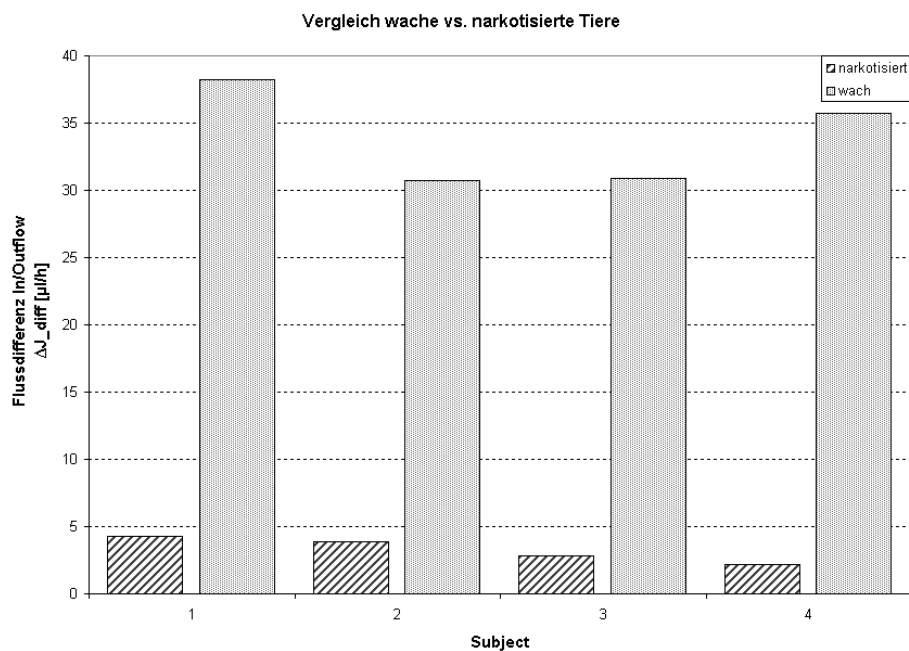
Bei der Messung in wachen Tieren ist es notwendig, die Relativbewegungen der Tiere zur stationären Pumpe auszugleichen. Das wurde durch den Einbau eines Swivels (Abb. 2.30) in

den Flüssigkeitspfad möglich. Wie in Abbildung 2.32 ersichtlich, ergibt sich dadurch eine Schlauchlänge von cirka 2m. Die Schlauchlänge und das Swivel ergeben im Flüssigkeitspfad, im Vergleich mit dem Setup zur Messung in narkotisierten Tieren (Abb. 2.29), einen erhöhten Widerstand. Der daraus resultierende größere Druckverlust führt dazu, dass es zu einem Ausgasen der Flüssigkeit in der Leitung kommt, wodurch die kontinuierliche Flüssigkeitssäule unterbrochen wird. Dies führt zu einer verminderten Flussrate im Outflow Zweig und in weiterer Folge zu einer Differenz zwischen eingebrachtem und abgesaugtem Flüssigkeitsvolumen. Diese Flussdifferenz  $\Delta J_{diff}$  ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Zum Vergleich wurden die Werte aus dem Ionic Reference Versuch, welcher mit narkotisierten Tieren durchgeführt wurde, beigelegt.

Die durchschnittliche Flussdifferenz bei der Messung in wachen Tieren betrug  $33,9 \frac{\mu l}{h}$ . Über ein Messintervall von 6 Stunden sammelt sich etwa  $180 - 230 \mu l$  Flüssigkeit im Gehirn der Tiere, das entspricht 30% - 35% des Gesamtvolumens des Rattenhirns [16]. Im Gegensatz dazu wurde mit dem Setup für narkotisierte Tiere eine Flussdifferenz von durchschnittlich  $3,3 \frac{\mu l}{h}$  festgestellt. Über ein Messintervall von 6 Stunden sind dies 3,3% des gesamten Hirnvolumens einer Ratte.



**Abb. 3.5:** Langzeitversuch mit 2 Tieren



**Abb. 3.6:** Flussdifferenz zwischen In-/Outflow bei der Messung in wachen und in narkotisierten Tieren

# Kapitel 4

## Diskussion

Der Pilotversuch sollte die Fragestellung beantworten, ob es mit dem Versuchsaufbau (Abb. 2.13), Agarose Gel mit Glukose, möglich ist, die Unterschiede im Austauschverhalten zwischen verschiedenen Katheterspizentypen festzustellen. In Abbildung 3.1 sind die mittleren Glukosekonzentrationen der drei getesteten Katheterspizentypen (Abb. 2.11) dargestellt. Man erkennt, dass in den Proben der S-Type die niedrigsten Glukosekonzentrationen gemessen wurden, beim L-Type wurden die höchsten Konzentrationen gemessen und der M-Type liegt dazwischen. Aus den unterschiedlichen Glukosekonzentrationen kann man schließen, dass die Katheterspizentypen ein unterschiedliches Austauschverhalten aufweisen. Die Glukosekonzentration im Agarose Gel wurde mit 10% angelegt. Die mit der cOFM gewonnenen Proben lagen über der oberen Messbereichsgrenze des Glukose Analyserätes und mussten daher verdünnt werden. Durch die Verdünnung ist ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor in die Ergebnisse eingeflossen. Daher wurde die Glukosekonzentration im Agarose Gel für den Hauptversuch auf 2,5% herabgestezt. In Abbildung 3.3 ist die mittlere Flussrate aller Katheter dargestellt. Der erwartete Wert für den Fluss war  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ , es konnten aber nur durchschnittlich weniger als  $0,67 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  erreicht werden, da die Flussrate bei den verwendeten Peristaltikpumpen nicht ausschließlich von der Pumpendrehzahl abhängig ist, sondern auch vom Anpressdruck der Einspannvorrichtung für die Pumpschläuche. Im Pilotversuch wurden die Pumpschläuche in verschiedenen Kanäle eingespannt, der Anpress-

druck ist dabei nicht exakt einstellbar. Für den Hauptversuch wurde die Pumpendrehzahl erhöht und der Pumpschlauch für den zuführenden und den absaugenden Zweig gemeinsam in einen Kanal eingespannt, dadurch wird sichergestellt, dass beide dem gleichen Anpressdruck ausgesetzt sind. Da die Flussrate über die Probenmenge berechnet wurde, können der Effekt der Verdunstung sowie kondensierte Probenflüssigkeit am Parafilm, welcher vor der Abwage der gefüllten Vials entfernt wurde, Auswirkung auf die Höhe der Flussrate haben. Um die Verdunstung der Probenflüssigkeit zu minimieren, wurden die im Hauptversuch verwendeten Vials unter Verwendung von Cool Packs gekühlt. Der erste Wert der Messreihe in Abbildung 3.3 ist auffallend niedriger als die übrigen. Da beim Einbringen der Kathetereinsätze der Hohlraum in der Guide-Kanüle nicht mit Perfusat gefüllt war, wurde zu Beginn der Messung Luft abgesaugt, wodurch die Flüssigkeitssäule im Outflow Pumpschlauch unterbrochen wurde. Dadurch kam die geringe Probenmenge zustande. Im Hauptversuch wurden daher die Guide-Kanüle vor dem Einbringen der Kathetereinsätze mit Perfusat aufgefüllt. Der Versuchsaufbau mit Agarose Gel ist grundsätzlich dazu geeignet die Unterschiede im Austauschverhalten zwischen Katheterspitzentypen darzustellen, die oben erwähnten Lösungen sind in den Versuchsaufbau des Hauptversuchs eingeflossen.

Der Hauptversuch sollte die Unterschiede im Austauschverhalten zwischen verschiedenen Katheterspitzentypen darstellen. In Abbildung 3.2 sind die mittleren Glukosekonzentrationen der zwei getesteten Katheterspitzenvarianten (Abb. 2.17) dargestellt. Die dargestellten Verläufe zeigen die Abnahme der mittleren Glukosekonzentration über die Dauer der Messung. Man erkennt, dass die Proben, die mit der Katheterspitzenvariante L-Type gewonnen wurden, höhere Glukosekonzentrationen aufweisen als jene mit der Katheterspitzenvariante M-Type. Der Unterschied zwischen den absoluten Glukosekonzentrationen beträgt 22,8%, bezogen auf die mit der Katheterspitzenvariante L-Type gemessenen Konzentrationen. Die zeitliche Abnahme der Glukosekonzentration ist bei beiden Katheterspitzenvarianten annähernd gleich. Das lässt den Schluss zu, dass die Katheterspitzenvariante L-Type in der Lage ist, in der gleichen Zeit eine größere Menge Glukose aus dem Agarose Diffusionsmodell zu gewinnen, als die Katheterspitzenvariante M-Type. Bei der in-vivo

Anwendung der Katheterspitzenvariante L-Type besteht die Gefahr, dass beim Einbringen des Kathetereinsatzes in die Guide-Kanüle vor der Messung, die BHS erneut geöffnet wird, wodurch eine Messung innerhalb der intakten BHS nicht möglich ist. Dies ist bei der Katheterspitzenvariante M-Type, und ebenso bei der im Pilotversuch zusätzlich verwendeten S-Type, durch das verkürzte Polyimidröhrchen nicht der Fall. Die Katheterspitzenvariante S-Type zeigte aber schon im Pilotversuch (Abb. 3.1) ein schwächeres Austauschverhalten als die M-Type, ohne Vorteile bezüglich der Gefahr der neuerliche Öffnung der BHS zu haben. Daher wurde die Katheterspitzenvariante S-Type im Hauptversuch nicht mehr eingesetzt. Insgesamt überwiegt der Vorteil der Katheterspitzenvariante M-Type, nämlich das minimierte Risiko der Öffnung der BHS vor der Messung, gegenüber dem Nachteil des schwächeren Austauschverhaltens. In Abbildung 3.3 ist die mittlere Flussrate aller Katheter dargestellt. Der erwartete Wert der Flussrate von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  bei der zu Beginn konstant eingestellten Pumpendrehzahl von 0,24rpm wurde nicht erreicht. Die Flussrate liegt mit durchschnittlich  $1,28 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  über dem erwarteten Wert. Um eine zu Beginn eingestellte Flussrate über die gesamte Messdauer konstant zu halten ist es daher notwendig, den Fluss nach jedem Sammelintervall über die Probenmenge zu berechnen und eine entsprechende Korrektur der Pumpendrehzahl durchzuführen. Der Versuch konnte die Unterschiede im Austauschverhalten zwischen zwei Katheterspitzentypen darstellen, die Katheterspitzenvariante M-Type wurde wegen des Vorteils die BHS bei Einbringung in die Guide-Kanüle nicht zu öffnen als zukünftiges Design ausgewählt.

Der Ionic Reference Versuch sollte zeigen, wie hoch die Recovery des Katheters für Natriumionen im Gehirn von Ratten in-vivo ist und ob die Recovery über einen Zeitraum von 3 Wochen konstant bleibt. Abbildung 3.4 zeigt die mit dem cOFM Katheter gemessene Natriumionenkonzentration im Gehirn. Die Ergebnisse von 8 Tieren wurden gemittelt und auf die physiologische Natriumionenkonzentration im Gewebe bezogen, was der Recovery für Natriumionen entspricht. Die Messreihe ist gegliedert in zwei Abschnitte. Der erste Abschnitt zeigt die Recovery des Katheters bei einer Flussrate von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ , der zweite Abschnitt zeigt die Recovery bei einer Flussrate von  $0,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ . Es ist klar zu sehen, dass die Recovery

bei verminderter Flussrate höher ist. Da bei niedriger Flussrate das Perfusat länger mit dem Hirngewebe in Kontakt ist, können mehr Natriumionen in das Perfusat diffundieren, wodurch sich eine höhere Natriumionenkonzentration in der Probe ergibt. Die Recovery für Natriumionen beträgt 30% bei einer Flussrate von  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  und 45% bei einer Flussrate von  $0,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ . Durch die Bestimmung der Recovery einer speziellen Substanz können, anhand der gemessenen cOFM Probenkonzentrationen, Rückschlüsse auf die aktuelle Konzentration dieser Substanz im Gehirn gezogen werden. Die Recovery ist nur für eine Substanz gültig, für jede andere Substanz muss die Recovery in einem eigenen Experiment bestimmt werden. Die mittlere Natriumionenkonzentration von 2 Tieren über den Zeitraum von 3 Wochen ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Die beiden Verläufe liegen bei 30% und halten diesen Wert auch über die gesamte Dauer. Das bedeutet, dass die Recovery des cOFM Katheters auch über einen längeren Zeitraum, bis zu 3 Wochen, stabil bleibt. Der Unterschied zwischen den beiden Tieren ergibt sich durch Toleranzen in der Katheterproduktion und Unterschiede im Austauschverhalten. Die Recovery des cOFM Katheters für Natriumionen bei  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  beträgt 30% und bei  $0,5 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  45%. Die 30% Recovery bei  $1 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$  ist über 3 Wochen stabil.

Es sollte gezeigt werden, dass das cOFM System auch für die Messung von Substanzen im Gehirn von wachen, sich frei bewegenden Tieren geeignet ist. Das Diagramm in Abbildung 3.6 zeigt die Differenz zwischen eingebrachtem und abgesaugtem Perfusat- bzw. Probenvolumen bei 4 Tieren, berechnet für die gesamte Dauer der Messung für das verwendete Setup (Abb. 2.32). Zum Vergleich wurde die Differenz zwischen dem eingebrachten und abgesaugten Perfusat- bzw. Probenvolumen für 4 Tiere aus dem Ionic Reference Versuch (Abb. 2.29), welcher mit narkotisierten Tieren durchgeführt wurde, für die gleiche Messdauer beigelegt. Man erkennt, dass die Differenz bei dem Setup zur Messung in wachen Tieren größer ist als bei der Messung in narkotisierten Tieren. Das Setup zur Messung in wachen Tieren weist im Vergleich zum Setup zur Messung in narkotisierten Tieren folgende Unterschiede auf:

- Größere Schlauchlänge



- Swivel
- Peristaltikpumpen

Die größere Schlauchlänge und das Swivel im Flüssigkeitspfad stellen einen erhöhten Widerstand dar. Dieser hat einen erhöhten Druckverlust in der Leitung zur Folge, wodurch der Unterdruck im Outflow Schlauch abfällt. Dies führt dazu, dass die Flüssigkeit im Outflow Schlauch ausgast und dadurch die kontinuierliche Flüssigkeitssäule, die für einen gleichförmigen Fluss gegeben sein muss, unterbricht. Die unterschiedliche Flussrate zwischen Inflow und Outflow führt zu einer Volumendifferenz, die sich im Gehirn der Tiere ansammelt. Das im Gehirn verbliebene Flüssigkeitsvolumen (Ödem), wirkt sich negativ auf das Messergebnis aus, da es zu einer Verdünnung der interstitiellen Flüssigkeit in unmittelbarer Umgebung des Katheters kommt. Das Volumen, welches das Ödem einnimmt, führt zu einer Verdrängung, wodurch der Druck im Gehirn ansteigt. Der gesteigerte Druck im Gehirn bewirkt einen unphysiologischen Zustand, der entsprechend falsche Ergebnisse verursacht und den Tod der Tiere zur Folge haben kann. Die Auswirkungen des Ödems zeigten sich in den Versuchen am Verhalten der Tiere durch verminderte Reflexe und Lethargie. Während der Versuche an 30 Tieren starben 5 Tiere an den Folgen eines Ödems. Die Berechnung der Flussrate über das Probenvolumen gibt nur über die Flussrate des Outflow Auskunft, die Flussrate des Inflow wird auf diese Weise nicht berücksichtigt. Um die Flussrate des Inflow berechnen zu können, muss das Volumen der eingebrachten Flüssigkeit bestimmt werden. Dies kann durch Bestimmung des Gewichtsverlust des Perfusatbehälters geschehen, aus dem das eingebrachte Perfusatvolumen und in weiterer Folge die Flussrate des Inflow berechnet werden kann. Die Vergleichsdaten stammen aus dem Ionic Reference Versuch, der mit Spritzenpumpen, verkürzten Schläuchen und ohne Swivel durchgeführt wurde. Die Narkose der Tiere ermöglichte es die Schläuche zu verkürzen und das Swivel aus dem Flusspfad zu entfernen, wodurch die Flüssigkeitsreibung im Flusspfad stark reduziert wurde. Dadurch blieb der Unterdruck im Outflow Zweig über dem Niveau, bei dem das Ausgasen der Flüssigkeit beginnt und die Flüssigkeitssäule durch Gaseinschlüsse unterbrochen wird. Die Unterbrechung der kontinuierlichen Flüssigkeitssäule im Outflow Zweig führt zu einer

verringerten Pumpleistung und zu einem Ungleichgewicht zwischen In- und Outflow. Eine weitere Verbesserung der Präzision brachte die Verwendung von Spritzenpumpen, wodurch sich die Größe des Ödems weiter verringerte. Das cOFM System ist zur Messung in wachen, sich frei bewegenden Tieren mit Peristaltikpumpen nicht geeignet.

# Literaturverzeichnis

- [1] BENVENISTE, H. ; DREJER, J. ; SCHOUSBOE, A. ; DIEMER, N. H.: Regional cerebral glucose phosphorylation and blood flow after insertion of a microdialysis fiber through the dorsal hippocampus in the rat. In: *J Neurochem* 49 (1987), Sep, Nr. 3, S. 729–734
- [2] BODENLENZ, M. ; SINNER, F. ; MAGNES, C. ; DRUML, T. ; GRUENDHAMMER, T. ; SCHALLER, H.C. ; WUTTE, A. ; ELLMERER, M. ; REGITTNIG, W. ; SCHAUPP, L. ; WACH, P. ; 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 (Abstract). In: *Clin.Pharmacol.Ther.* 47 (2004), S. 398
- [3] BUNGAY, Peter M. ; MORRISON, Paul F. ; DEDRICK, Robert L. ; CHEFER, Vladimir I. ; ZAPATA, Augustin: Principles of quantitative microdialysis. In: *Handbook of Microdialysis* 16 (2007), S. 131–167. [http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339\(06\)16008-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339(06)16008-7). – DOI 10.1016/S1569-7339(06)16008-7
- [4] CHAURASIA, Chandra S. ; MÜLLER, Markus ; BASHAW, Edward D. ; BENFELDT, Eva ; BOLINDER, Jan ; BULLOCK, Ross ; BUNGAY, Peter M. ; DELANGE, Elizabeth C M. ; DERENDORF, Hartmut ; ELMQUIST, William F. ; HAMMARLUND-UDENAES, Margareta ; JOUKHADAR, Christian ; KELLOGG, Dean L. ; LUNTE, Craig E. ; NORDSTROM, Carl H. ; ROLLEMA, Hans ; SAWCHUK, Ronald J. ; CHEUNG, Belinda W Y. ; SHAH, Vinod P. ; STAHL, Lars ; UNGERSTEDT, Urban ; WELTY, Devin F. ; YEO, Helen: AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. In: *Pharm Res* 24 (2007), May, Nr. 5, 1014–1025. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-006-9206-z>. – DOI 10.1007/s11095-006-9206-z
- [5] CLAPP-LILLY, K. L. ; ROBERTS, R. C. ; DUFFY, L. K. ; IRONS, K. P. ; HU, Y. ; DREW, K. L.: An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe. In: *J Neurosci Methods* 90 (1999), Aug, Nr. 2, S. 129–142
- [6] EK, Carl J. ; DZIEGIELEWSKA, Katarzyna M. ; STOLP, Helen ; SAUNDERS, Norman R.: Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). In: *J Comp Neurol* 496 (2006), May, Nr. 1, 13–26. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20885>. – DOI 10.1002/cne.20885

- [7] GROOTHUIS, D. R. ; WARD, S. ; SCHLAGETER, K. E. ; ITSKOVICH, A. C. ; SCHWERIN, S. C. ; ALLEN, C. V. ; DILLS, C. ; LEVY, R. M.: Changes in blood-brain barrier permeability associated with insertion of brain cannulas and microdialysis probes. In: *Brain Res* 803 (1998), Aug, Nr. 1-2, S. 218–230
- [8] LANGE, E. C. ; BOER, A. G. ; BREIMER, D. D.: Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. In: *Adv Drug Deliv Rev* 45 (2000), Dec, Nr. 2-3, S. 125–148
- [9] LANGE, E. C. ; DANHOF, M. ; BOER, A. G. ; BREIMER, D. D.: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. In: *Brain Res Brain Res Rev* 25 (1997), Sep, Nr. 1, S. 27–49
- [10] LIHUI WENG, Lina Zhang Xianmin Z. Songmiao Liang L. Songmiao Liang ; XU, Jian: Transport of Glucose and Poly(ethylene glycol)s in Agarose Gels Studied by the Refractive Index Method. In: *Macromolecules* 38 (2005), Nr. 12, S. 5236–5242. <http://dx.doi.org/10.1021/ma047337w>. – DOI 10.1021/ma047337w
- [11] MYERS, R. D. ; ADELL, A. ; LANKFORD, M. F.: Simultaneous comparison of cerebral dialysis and push-pull perfusion in the brain of rats: a critical review. In: *Neurosci Biobehav Rev* 22 (1998), May, Nr. 3, S. 371–387
- [12] PLOCK, Nele ; KLOFT, Charlotte: Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. In: *Eur J Pharm Sci* 25 (2005), May, Nr. 1, 1–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2005.01.017>. – DOI 10.1016/j.ejps.2005.01.017
- [13] QU, Y. ; GUCHT, E. V. ; MASSIE, A. ; VANDENBUSSCHE, E. ; VANDESANDE, F. ; ARCKENS, L.: In vivo microdialysis in the visual cortex of awake cat. III: histological verification. In: *Brain Res Brain Res Protoc* 7 (2001), Apr, Nr. 1, S. 52–60
- [14] ROSENBLOOM, A. J. ; FERRIS, R. L. ; FERRIS, R. ; SIPE, D. M. ; RIDDLE, S. A. ; CONNOLLY, N. C. ; ABE, K. ; WHITESIDE, T. L.: In vitro and in vivo protein sampling by combined microdialysis and ultrafiltration. In: *J Immunol Methods* 309 (2006), Feb, Nr. 1-2, 55–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2005.11.013>. – DOI 10.1016/j.jim.2005.11.013
- [15] ROSENBLOOM, Alan J. ; SIPE, David M. ; WEEDN, Victor W.: Microdialysis of proteins: performance of the CMA/20 probe. In: *J Neurosci Methods* 148 (2005), Oct, Nr. 2, 147–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.04.018>. – DOI 10.1016/j.jneumeth.2005.04.018
- [16] SAHIN, B. ; ASLAN, H. ; UNAL, B. ; CANAN, S. ; BILGIC, S. ; KAPLAN, S. ; TUMKAYA, L.: BRAIN VOLUMES OF THE LAMB, RAT AND BIRD DO NOT

- SHOW HEMISPHERIC ASYMMETRY: A STEREOLOGICAL STUDY. In: *Image Anal Stereol* 20 (2001), S. 9–13
- [17] STAMFORD, J. A.: In vivo voltammetry: some methodological considerations. In: *J Neurosci Methods* 17 (1986), Jul, Nr. 1, S. 1–29
- [18] STÅHLE, L.: On mathematical models of microdialysis: geometry, steady-state models, recovery and probe radius. In: *Adv Drug Deliv Rev* 45 (2000), Dec, Nr. 2-3, S. 149–167
- [19] ZLOKOVIC, Berislav V.: The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. In: *Neuron* 57 (2008), Jan, Nr. 2, 178–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>. – DOI 10.1016/j.neuron.2008.01.003

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Bildgebende Verfahren . . . . .	6
2.2	Mikrodialyse Katheter . . . . .	6
2.3	Funktionsschema der cOFM Messung . . . . .	9
2.4	Substanzen gelangen durch Diffusion und Konvektion in das Perfusat . . . . .	9
2.5	Schematische Darstellung der Bestandteile des cOFM-Katheters . . . . .	10
2.6	Rohmaterialien für einen cOFM-Katheter . . . . .	13
2.7	Guide-Kanüle und Dummy von JR/HEALTH . . . . .	13
2.8	Guide-Kanüle und Dummy im zusammengebauten Zustand . . . . .	14
2.9	Kathetereinsatz . . . . .	15
2.10	Spitze des Katheters (außen FEP-Schlauch, innen Polyimidröhre) . . . . .	15
2.11	Designvariationen des Katheters . . . . .	20
2.12	Matrixplatte zur Katheterbefestigung . . . . .	21
2.13	Messplatzaufbau des in-vitro Experiments . . . . .	22
2.14	Katheter in Matrixplatte . . . . .	22
2.15	Glukosemessgerät SuperGL - Analysator . . . . .	23
2.16	Erwarteter Konzentrationsverlauf, beschrieben durch die Modellfunktion (2.3) . . . . .	24
2.17	Im Hauptversuch verwendete Designvariationen des Katheters . . . . .	26
2.18	Anästhesie Einheit - Isoflurane Vaporizer . . . . .	30
2.19	Stereotaktischer Rahmen für Ratten - David Kopf Instruments . . . . .	31
2.20	Bregma am Rattenschädel . . . . .	32
2.21	Zentrieren der Bohrspitze . . . . .	32
2.22	Temperaturregler des homeothermischen Systems . . . . .	33
2.23	Schematische Darstellungen . . . . .	34
2.24	Fixierschrauben am Schädel . . . . .	35
2.25	Positionieren der Guide-Kanüle mit Dummy . . . . .	36
2.26	Aushärten des Dentalzements mit UV-Licht . . . . .	37
2.27	Programmierbare Spritzenpumpe Aladdin 2000 . . . . .	40
2.28	Gilson Miniplus 3 Peristaltikpumpe . . . . .	41
2.29	Messplatzaufbau mit 2 Tieren . . . . .	42
2.30	Swivel mit Konterarm . . . . .	46
2.31	Implantat für die Messung am wachen Tier (Neben Katheter: Aufnahme für Führungsdraht) . . . . .	47
2.32	System zur Messung an wachen, sich frei bewegenden Tieren . . . . .	48

3.1	Mittlere Glukosekonzentration aus dem Pilot Versuch . . . . .	51
3.2	Mittlere Glukosekonzentration aus dem Hauptversuch . . . . .	52
3.3	Mittlere Flussraten aus den in-vitro Versuchen . . . . .	53
3.4	In-vivo Recovery für Na <sup>+</sup> Ionen . . . . .	54
3.5	Langzeitversuch mit 2 Tieren . . . . .	56
3.6	Flussdifferenz zwischen In-/Outflow bei der Messung in wachen und in narkotisierten Tieren . . . . .	56