

# Methodik und Anwendung der Mikrodialyse\*

*Methods and applications of microdialysis*

U. Korth<sup>1</sup> und J. Klein<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. K. van Ackern)

<sup>2</sup> Pharmakologisches Institut der Universität Mainz

**Zusammenfassung:** Die Mikrodialyse ist ein minimal invasives Verfahren zur kontinuierlichen Gewinnung frei diffusibler, wasserlöslicher Substanzen aus dem Extrazellulärraum verschiedener Gewebe. Die Verfügbarkeit von für den klinischen Gebrauch zugelassenen Mikrodialysesonden und -pumpen sowie Fortschritte der chemischen Analytik haben in den letzten Jahren zur weiten Verbreitung der Methode in der klinischen Forschung beigetragen. Der vorliegende Artikel zeigt Möglichkeiten und Grenzen der Methode auf und stellt exemplarisch einige Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Forschung vor.

## Einleitung

Die Untersuchung metabolischer Prozesse in gesunden und erkrankten Organen ist eine fundamentale Aufgabe der medizinischen Forschung und Basis für die Behandlung der Patienten. Das meiste Wissen über diese Prozesse stammt aus In-vitro-Studien, d.h. Studien mit Organ- und Gewebeproben, Zellen oder subzellulären Strukturen. Diese Studien sind jedoch von begrenzter Aussagekraft für die Verhältnisse im Gesamtorganismus, da die Homöostase des Stoffwechsels durch die Präparation der biologischen Proben beeinflusst wird. In homogenisierten Gewebeproben sind darüber hinaus freie und proteingebundene, intra- und extrazelluläre Metabolite nicht mehr zu unterscheiden. Daher sind für die klinische Praxis In-vivo-Studien von größerer Aussagekraft; doch Untersuchungen von Stoffwechselprodukten können bei Patienten nur in zugänglichen Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Liquor, Urin) durchgeführt werden. Da aber die Konzentration von Metaboliten im Blut nicht der des Gewebes entsprechen muß, weil Bindungen an Proteine oder kapilläre Barrieren (z.B. Blut-Hirn-Schranke) unterschiedliche Konzentrationen in Blut oder Liquor bedingen können, sollte eine optimale Methodik ein kontinuierliches Monitoring von Metaboliten in vivo direkt im Extrazellulärraum (EZR) erlauben. Die nichtinvasiven bildgebenden Verfahren, wie die Positronen-Emissionstomographie (PET) und die Magnetische Resonanzspektroskopie (MRS), lösen dieses Problem nicht oder nur teilweise. Zwar sind diese Verfahren in vivo anwendbar, jedoch teuer und noch nicht flächendeckend verfügbar. Vor allem aber können diese Verfahren nur solche Metabolite messen, die in hohen Konzentrationen (im millimolaren Bereich, z.B. Glukose, Laktat, Glycerol) vorliegen. Verän-

derungen von Metaboliten, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, können aber (noch) nicht verfolgt werden, und eine Unterscheidung zwischen intrazellulären und extrazellulären Kompartimenten ist in keinem Fall möglich (5, 19).

## Methoden mit Zugang zum Extrazellulärraum

Die Notwendigkeit extrazellulärer Messungen wurde zunächst in den Neurowissenschaften erkannt, weil man Methoden zur Messung von extrazellulär abgegebenen Neurotransmittern benötigte, um die Aktivitäten spezifischer Nervenbahnen zu quantifizieren. Eine frühe Technik mit kontinuierlichem Zugang zum EZR des anästhesierten Tieres war die kortikale Cup-Technik, bei der ein kleiner Behälter (die "Cup") auf die freigelegte weiche Hirnhaut des Versuchstieres geklebt wurde (25). Später wurde die Push-pull-Technik entwickelt, bei der eine Perfusionsflüssigkeit gleichzeitig in das zu untersuchende Hirngewebe infundiert und abgesaugt wird (30). Das Verfahren ist aufwendig und wird heute nur von einer kleinen Anzahl spezialisierter Labors durchgeführt. Dagegen hat sich seit den siebziger Jahren die sog. "Mikrodialyse" als Methode der Wahl durchgesetzt, um Zugang zum EZR des Gehirns und auch peripherer Gewebe zu erhalten (2, 6, 34). Wir werden nun im folgenden zunächst auf die Methodik der Mikrodialyse eingehen, um später anhand einiger Beispiele Einsatzmöglichkeiten der Methode in der Anästhesiologie zu umreißen.

## Prinzip der Mikrodialyse

Die Mikrodialyse stellt die derzeit am weitesten verbreitete Methode zur Gewinnung von Proben aus dem Extrazellulärraum dar. Das Prinzip der Mikrodialyse beruht auf der Einführung einer speziellen Perfusionssonde in das zu untersuchende Gewebe, die eine semipermeable Membran enthält. Mit einer Präzisionspumpe wird die Perfusionslösung langsam (0,1-10 µl/min) durch die Mikrodialysesonde befördert und das Dialysat kontinuierlich gesammelt. Die semipermeable Membran der dünnen, vorn geschlossenen

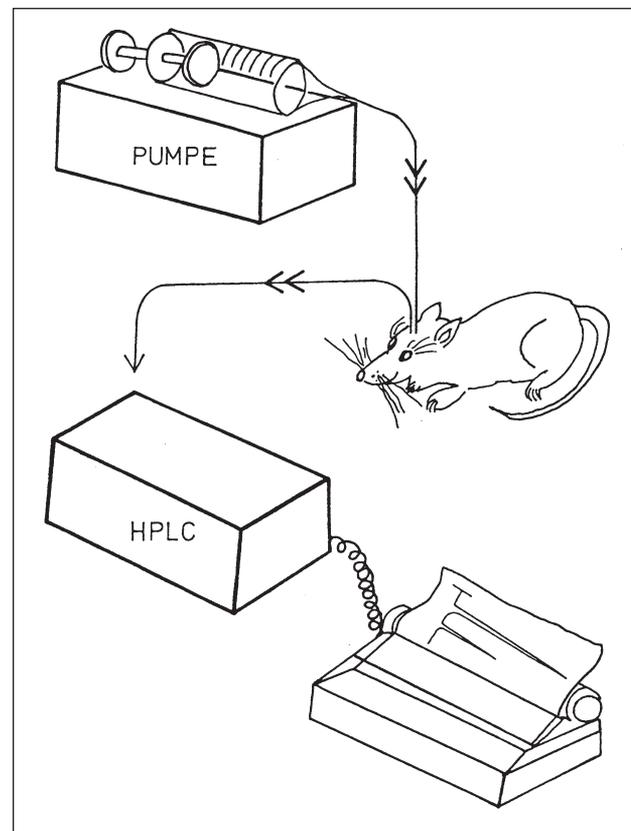
\* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Klaus van Ackern zum 60. Geburtstag

Sonde ermöglicht den Austausch der Substanzen im EZR mit der Perfusionslösung, wobei die Unterschiede der Stoffkonzentrationen als treibende Kraft für die passive Diffusion dienen. Das gesammelte Mikrodialysat wird dann auf die interessierenden Metabolite untersucht, meist mittels hochempfindlicher HPLC-Methoden (Abb. 1).

Die Methode bietet zahlreiche Vorteile. So können alle kleinmolekularen Substanzen (Metabolite, Hormone, Neurotransmitter) in das Dialysat diffundieren und parallel analytisch bestimmt werden, während großmolekulare Stoffe (>1-10 kDa), die die analytische Bestimmung stören würden, im EZR verbleiben. Das Dialysat ist proteinfrei, zeitaufwendige Vorbehandlungen (Deproteinierungen) können entfallen. Änderungen der Stoffkonzentrationen können "on line" verfolgt werden, z.B. Änderungen von Neurotransmitterkonzentrationen nach Behandlung mit Arzneimitteln oder Änderungen von Metaboliten des Energiestoffwechsels während Ischämie oder Muskelarbeit. Dabei kann der Proband bzw. das Versuchstier gleichzeitig als Kontrolle (basale Werte, Meßwerte vor Versuch) als auch als Versuchsobjekt (Meßwerte während und nach Versuch) dienen, was die notwendige Anzahl an Versuchen drastisch reduziert. Schließlich kann die Dialyse-sonde auch dazu genutzt werden, um Substanzen direkt in den EZR zu applizieren; so können biochemische Prozesse bis zu 1 mm im Umfeld der Sonde manipuliert (1) und lokale Wirkungen verfolgt werden.

## Aufbau der Mikrodialysesonden

Mikrodialysesonden wurden seit ihrer ersten Beschreibung durch *Bito et al.* (2) vor allem von der Arbeitsgruppe um Prof. *Ungerstedt* im Karolinska Institut, Stockholm, weiterentwickelt und verbessert (35). Kommerziell erhältliche Sonden werden mit verschiedenen Membranen (z.B. Polycarbonat, Cuprohan, Polyamid) unterschiedlicher Porengröße angeboten; diese Modelle sind z.T. auch für den klinischen Gebrauch am Menschen zugelassen. In unseren Labors erstellen wir Sonden für tierexperimentelle Untersuchungen nach der Methode von *Westerink* und Mitarbeitern (32) selbst. Es handelt sich dabei um konzentrische, I-förmige Sonden mit parallel verlaufendem Zu- und Abstrom der Perfusionslösung (Abb. 2). Der Eigenbau hat neben der Kostenersparnis den Vorteil, die Länge des Schaftes, der Membran und auch die mechanische Stabilität der Sonde den Erfordernissen des jeweiligen Versuchs anpassen zu können; so konnten wir z.B. die Sonden an die Bedingungen des Mäusehirns anpassen, um gentechnisch veränderte Tiere zu dialysieren. Neben dieser Bauart werden von anderen Arbeitsgruppen auch transversale Sonden verwendet, bei denen die Membran in einer Linie zwischen dem zu- und abführendem Schenkel eingebaut ist; dieser Sondentyp findet z.B. bei der transdermalen Mikrodialyse seine Anwendung. Schließlich wurden für Messungen an Herz und Muskeln auch flexible Mikrodialysesonden entwickelt.

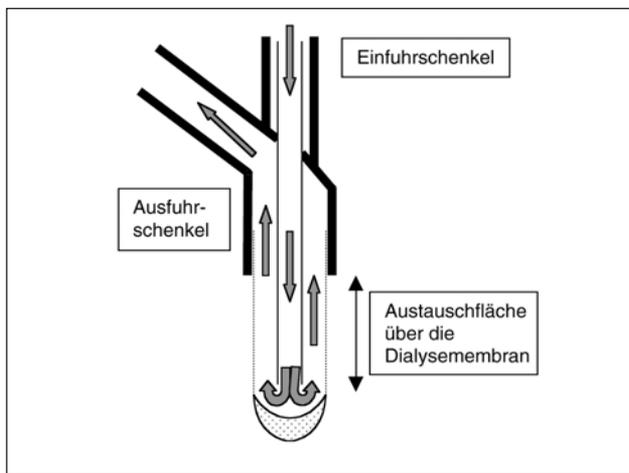


**Abbildung 1:** Schematischer Versuchsaufbau eines Mikrodialyseexperimentes.

Mit einer Präzisionspumpe wird eine Perfusionslösung mit niedriger Flußrate (0,1-10 µl/min) durch eine Mikrodialyse-sonde gefördert, die am Vortag des Experimentes in das Gehirn des Versuchstieres implantiert wurde. Während der Versuchsdauer ist das Tier wach und kann sich in seinem Käfig frei bewegen. Das Dialysat wird aus dem abführenden Schenkel der Sonde gesammelt und die Konzentration der Metabolite mit hochempfindlichen Meßmethoden, meist der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. (Wir danken Frau Dr. A. Köppen für die Überlassung der Zeichnung).

## Implantation der Sonden

Bei Versuchstieren erfolgt die Implantation der Sonden meist in Narkose. Bei Anwendungen im Gehirn wird die Sonde am 1. Versuchstag unter stereotaktischer Kontrolle implantiert, die Untersuchung kann dann am wachen, frei beweglichen Tier durchgeführt werden. Der Einfluß von Narkose auf verschiedene Meßgrößen kann so ausgeschlossen, aber auch gezielt studiert werden. Die Implantation der Sonden löst ein lokales Gewebetrauma aus. In den ersten Stunden nach Implantation lassen sich ein schmaler Blutsaum entlang der Sonde und ein intra- und extrazelluläres Ödem im Umkreis von initial 50 µm um die Sonde nachweisen; auch ist die Blut-Hirn-Schranke für einige Stunden nicht mehr intakt (1). Experimente werden am besten am 2. und 3. Versuchstag durchgeführt, nachdem sich die metabolischen Veränderungen



**Abbildung 2:** Aufbau einer Mikrodialysesonde.

Ein- und Ausfuhrschenkel werden aus Polyethylen-schlauch gefertigt, der zur mechanischen Stabilisierung mit einem Metallröhrchen verstärkt werden kann. Über eine Silikafaser, die das Totraumvolumen des Einfuhrschenkels gering hält, gelangt die Perfusionslösung in den Austauschraum an der Sondenspitze, der von der Dialysemembran begrenzt wird. Der Rückstrom erfolgt parallel entlang der Membran in den abführenden Schenkel der Sonde.

der akuten Implantation wieder einreguliert haben. Ab dem 3. Tag setzt dann eine Gliosis ein, die die Perfusion des Gewebes beeinflusst und bald die Sonden umschließt. Alternativ zur akuten Sondenimplantation wird häufig die vorherige Implantation einer Führungskanüle empfohlen (z.B. eine Woche vor dem Versuch). Die Problematik des Gewebetraumas in situ nach Sondeneinführung ist jedoch auch bei Verwendung einer Führungskanüle gegeben.

In peripheren Geweben wird die Mikrodialysesonde mit Hilfe einer Führungskanüle in das Gewebe eingebracht. Auch hier tritt ein Gewebetrauma ein, daß sich in typischer Weise in einem Anstieg von aus dem Intrazellulärraum freigesetzten Substraten manifestiert. Die Wiedereinstellung der Homöostase dauert für die einzelnen Parameter in den Geweben unterschiedlich lang. Bei eigenen Untersuchungen im M. quadriceps von Patienten (21) wurden für Metabolite wie Glukose und Laktat bereits nach ca. 15 Minuten wieder "Steady state"-Bedingungen erreicht, so daß bereits kurz nach Einführung der Sonde sinnvolle Messungen möglich waren.

## Wiederfindungsrate ("Recovery")

Grundsätzlich entsprechen die Konzentrationen der Metabolite im Dialysat nicht unbedingt den absoluten Konzentrationen im Extrazellulärraum, da während der Perfusion nur ein teilweiser Ausgleich der Konzentrationen stattfindet. Eine Aussage über die "wahre" Konzentration im EZR ist vielmehr nur bei Kenntnis der Wiederfindungsrate ("Recovery") jedes einzelnen Metaboliten unter den jeweiligen Versuchsbedin-

gungen möglich. Folgende Faktoren beeinflussen die Wiederfindungsrate im Versuch:

### a) Länge und Eigenschaften der Membran.

Je länger die Austauschfläche der Sonde ist, um so höher wird die Wiederfindungsrate; ein Beispiel ist in Tabelle 1 (A) gezeigt. Sehr lange Membranen können allerdings zu einem Verlust von Dialyseflüssigkeit führen aufgrund des von nichtpermeablen Makromolekülen (Proteinen) aufgebauten osmotischen Gradienten; die Größenordnung dieses Volumenverlustes liegt allerdings nur bei wenigen Mikrolitern (z.B. 4-5  $\mu\text{l}$ / 30 min bei Perfusion des Skelettmuskels mit einer modifizierten Krebs-Henseleit- Pufferlösung (31)). Die Diffusion der Substanzen wird von der Porengröße der Membran limitiert, aber auch durch die physikochemischen Eigenschaften der Substanzen beeinflusst; so können sich die Diffusionseigenschaften und Wiederfindungsraten saurer oder geladener Metabolite in vitro in Abhängigkeit von der gewählten Membran recht deutlich unterscheiden. In vivo fallen diese Unterschiede meist geringer aus, da die Diffusionswiderstände im Gewebe wesentlich höher sind und deren Extraktion mehr begrenzen als die Eigenschaften der Membran (16). In jedem Fall sollte die Zusammensetzung der Perfusionslösung in möglichst vielen Qualitäten (Osmolarität, ionale Zusammensetzung, pH-Wert etc.) der des EZR entsprechen.

### b) Flußgeschwindigkeit der Perfusionslösung durch die Sonde (Tab. 1 (B)).

Sowohl zu niedrige als auch zu hohe Flußgeschwindigkeiten sind von Nachteil; es gilt, ein Optimum zu finden. Sehr niedrige Flußraten (0.1-0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) erhöhen die relative Ausbeute (Wiederfindungsrate) an zu messender Substanz, weil mehr Zeit für Diffusionsvorgänge zur Verfügung steht. Allerdings wird die absolute dialysierte Stoffmenge und das Analysenvolumen sehr klein, und die quantitative Bestimmung ist nur noch mit hochempfindlichen Nachweismethoden möglich; übliche Methoden sind die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), evtl. gekoppelt mit Massenspektrometrie, und die Kapillarelektrophorese. Höhere Flußraten (5-10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) erhöhen das Analysenvolumen, führen aber auch zu einer Abnahme der Wiederfindungsrate und der Stoffkonzentration im Dialysat. Hohe Flußraten üben auf die Dialysemembran einen hydrostatischen Druck aus, der zur Ultrafiltration von Flüssigkeit und damit zum Verlust von Perfusionslösung in das Gewebe führen kann. Außerdem führt der Konzentrationsgradient zwischen Perfusat und EZR besonders bei hohen Flußraten zu einer Drainage der Metabolite im Umfeld der Sonde und verändert damit die Homöostase in dem Milieu, welches man untersuchen will (1). Als optimal ist diejenige Flußrate anzusehen, die ein ausreichend großes Probenvolumen mit hinreichend hoher Metabolitenkonzentration für die zur Verfügung stehende Analytik lie-

**Tabelle 1:**

(A) In-vitro-Recovery verschiedener Metabolite in Abhängigkeit von der Membranlänge (Membran: Filtral AN69HF, Hospal Medizintechnik, Nürnberg) bei einer Flußrate von 2 µl/min. Wiederfindungsrate in (%) ± SEM von N = 4 Versuchen.

	Wiederfindungsrate (%) bei einer Membranlänge (cm)			
Metabolite	2	1,5	1	0,5
Glukose	60 ± 1	48 ± 6	39 ± 1	27 ± 2
Laktat	53 ± 2	46 ± 3	35 ± 1	21 ± 1
Pyruvat	74 ± 1	52 ± 3	43 ± 2	29 ± 1
Glutamat	45 ± 4	34 ± 4	27 ± 1	18 ± 1

(B) In-vitro-Recovery verschiedener Metabolite in Abhängigkeit von der Flußgeschwindigkeit (Membranlänge 1,5 cm). Wiederfindungsrate in (%) ± SEM von N = 4 Versuchen.

	Wiederfindungsrate (%) bei einer Flußrate (µl/min)			
Metabolite	10	5	2	0,3
Glukose	17 ± 1	22 ± 2	48 ± 6	99 ± 2
Laktat	13 ± 1	21 ± 2	46 ± 3	98 ± 5
Pyruvat	14 ± 2	23 ± 2	52 ± 3	99 ± 2
Glutamat	10 ± 2	17 ± 2	34 ± 4	85 ± 2

fert; optimale Flußraten sind nach unseren Erfahrungen meist 1-3 µl/min.

- c) *Diffusionseigenschaften der Metabolite im Gewebe.* Die Diffusionskoeffizienten in komplexen Medien wie in einem Gewebe sind niedriger als in wässrigen Lösungen, weil Zellmembranen die freie Diffusion behindern und der Extrazellulärraum, in dem ein ungehinderter Massentransport stattfinden kann, nur einen Bruchteil des Gewebevolmens beträgt (z.B. im Gehirn 15 - 20%). Auch beeinflussen Interaktionen mit membranständigen Makromolekülen, aktiver zellulärer Transport und Metabolismus ständig die Diffusionsgradienten. In mathematischen Modellen wird deshalb die "Tortuosität" als Maß der Diffusionseigenschaften der Metabolite im Gewebe verwendet und zu der in wässrigen Lösungen in Beziehung gesetzt, um die Wiederfindungsrate in vivo zu berechnen (27). Tortuosität und das Volumen des EZR sind aber in vivo keine statischen Größen, sondern können unter pathophysiologischen Bedingungen (z.B. Ischämie, epileptische Krampfanfälle) verändert sein.

## Quantitative Mikrodialyse

### In-vitro-Recovery

Die Kenntnis der tatsächlichen Konzentration einer Substanz im EZR ist gerade für klinische Fragestellungen von Bedeutung; Beispiele sind Glukosekonzentrationen bei Diabetikern oder die Gewebespiegel von Medikamenten. Die quantitative Bestimmung von Substanzen in der Extrazellulärflüssigkeit (EZF) erfordert die Kenntnis der Wiederfindungsrate. Eine einfache Methode zur Extrapolation der gemessenen

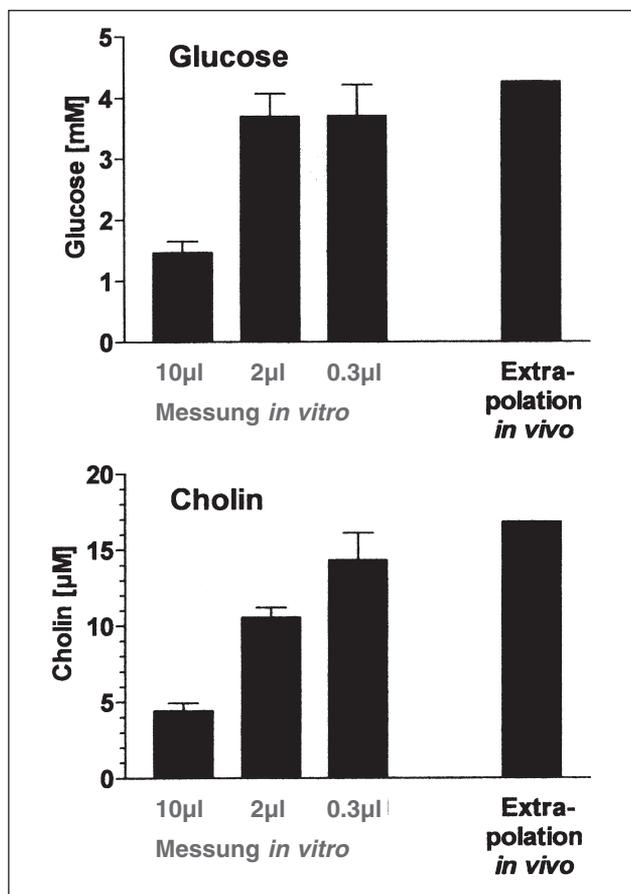
Werte ist die Bestimmung der "In-vitro-Recovery". Hierbei werden die Diffusionseigenschaften der Metabolite durch die Membran bei verschiedenen Flußraten in vitro gemessen, indem man die Sonde in eine Lösung bekannter Metabolitenkonzentrationen eintaucht und perfundiert. Die In-vitro-Recovery errechnet sich dann gemäß der Formel:

$$\text{Recovery}_{\text{in vitro}} = C_{\text{Dialysat}} / C_{\text{Medium}} \quad [1]$$

wobei mit  $C_{\text{Dialysat}}$  die Metabolitenkonzentration im Dialysat und  $C_{\text{Medium}}$  in der die Sonde umgebenden wässrigen Lösung bezeichnet wird. Bei bekannter In-vitro-Recovery werden die freien Gewebespiegel der dialysierten Substanzen oft gemäß der Formel:

$$C_i = C_{\text{Dialysat}} / \text{Recovery}_{\text{in vitro}} \quad [2]$$

berechnet, wobei  $C_i$  die Konzentration der Metabolite im EZR bezeichnet. Die In-vitro-Recovery kann mit geringem Zeitaufwand bestimmt werden und eignet sich z.B. zur Qualitätskontrolle der Membran vor und nach einem Versuch. Die Quantifizierung der extrazellulären Konzentration gibt die Gleichung [2] aber aufgrund der Tortuosität der EZF nur grob näherungsweise wieder. Dies wird in Abbildung 3 verdeutlicht: Bei vier Patienten, deren Energiestoffwechsel im Skelettmuskel in Mannheim mit der Mikrodialyse untersucht wurde, wurde der Gewebespiegel der Metabolite durch Extrapolation mit der exakten "Zero flow"-Methode (s. unten) bestimmt. Anschließend wurde die In-vitro-Recovery der gleichen Sonden im Labor untersucht. Der Vergleich der beiden Datensätze zeigte, daß die Berechnung der extrazellulären Konzentrationen gemäß Gleichung [2] falsch niedrige Ergebnisse liefert, und zwar besonders bei den hohen Flußraten. Der wahrscheinliche Grund dafür ist, daß



**Abbildung 3:** Quantitative Mikrodialyse: Vergleich zweier Methoden zur Messung und Berechnung der extrazellulären Konzentration von Glukose und Cholin im EZR des M. quadriceps von Patienten.

Bei vier Patienten, die sich einer elektiven Operation der unteren Extremität unterzogen, wurde eine Mikrodialyse-sonde (CMA/60, CMA Microdialysis, Stockholm, Schweden) in den M. quadriceps eingelegt und mit einer Ringerlösung bei abnehmenden Flussraten perfundiert. Die Konzentration der Metabolite im EZR wurde durch Extrapolation gemäß der "Zero flow"-Methode (s. Text) bestimmt, der Wert in dem schwarzen Balken dargestellt. Anschließend wurde mit denselben Sonden die In-vitro-Recovery bestimmt und die Konzentration der Metabolite im EZR für jede einzelne Flussgeschwindigkeit gemäß Formel (2) berechnet (s. Text) und in den grauen Balken dargestellt. Die Graphik zeigt, wie sich besonders bei hohen Flussgeschwindigkeiten ein falsch niedriger Wert bei der Berechnung der Konzentrationen im EZR nach der In-vitro-Recovery ergibt. Die Daten sind als Mittelwert ( $N = 4$ )  $\pm$  SEM angegeben.

die Metabolite in wässriger Lösung effektiver in das Dialysat übergehen als im Gewebe; zudem deuten die Werte für Cholin darauf hin, daß dieser Metabolit in vivo bei schnellen Flussraten im EZR verarmt und nur langsam (aus Blut oder Gewebe) nachgeliefert werden kann. Aufgrund dieser bekannten Probleme der Extrapolation werden in der Mikrodialyse-Literatur häufig nur prozentuale Veränderungen der zuvor gemessenen Basalwerte angegeben.

### In-vivo-Recovery

Zur Quantifizierung extrazellulärer Konzentrationen sind In-vivo-Verfahren zuverlässiger, aber auch aufwendiger als die In-vivo-Extrapolation. Folgende Methoden wurden entwickelt, um die In-vivo-Recovery unter den jeweils aktuellen Versuchsbedingungen in einem "Steady state"-Zustand zu bestimmen (5, 10).

a) Die "Zero flow"-Methode: Die Perfusionsgeschwindigkeit wird stufenweise reduziert und die Konzentration im Dialysat gemessen. Mittels nicht-linearer Regression wird die Konzentration bei der Flußrate null, die einer 100%igen Recovery und damit der Konzentration im EZR entspricht, errechnet. Da sich bei allen Flußgeschwindigkeiten zunächst Gleichgewichtszustände einstellen müssen, ist diese Methode recht zeitaufwendig, aber für alle Metabolite durchführbar.

b) Die "Near equilibrium"-Methode: Eine Sonde mit möglichst langer Austauschmembran wird mit der kleinstmöglichen Perfusionsrate durchspült, so daß sich die Konzentrationen in beiden Kompartimenten vollständig angleichen können. Das Dialysat, das in diesem Fall praktisch ein Ultrafiltrat des EZR darstellt, enthält dann die gleiche Zusammensetzung kleinmolekularer Metabolite wie der EZR. Probleme der Methode sind die kleinen Probenvolumina und die mögliche Verdunstung während der langen Sammelperioden. Für viele Metabolite wird bei einer Flußrate von ca. 0.3 µl/min eine 100%ige Wiederfindungsrate erreicht.

c) Die "No net flux"-Methode beruht auf dem Prinzip des bidirektionalen Flusses durch die Membran. Der Perfusionslösung werden die zu untersuchenden Metabolite in unterschiedlicher Dosierung zugesetzt, wobei höhere und niedrigere als die im Gewebe zu erwartenden Konzentrationen gewählt werden. Die Dialysatkonzentrationen werden graphisch gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen, und durch lineare Regression wird diejenige Konzentration ermittelt, bei der kein Nettotransport durch die Membran mehr stattfindet. Diese Konzentration entspricht dann dem extrazellulären Gehalt des Metaboliten. Dieses Verfahren ist bewährt zur Bestimmung der extrazellulären Konzentrationen endogener Substanzen; für exogene Substanzen (z.B. Arzneimittel) ist es weniger geeignet, weil die Substanzkonzentrationen im EZR während der Messungen konstant bleiben müssen.

d) Die "Retrodialyse" wird vor allem in pharmakologischen Untersuchungen eingesetzt. Dabei wird das Arzneimittel der Perfusionslösung zugesetzt und der Konzentrationsverlust des Pharmakons im Dialysat bestimmt. Da die Diffusionsgeschwindigkeit Sonde zu EZR die gleiche ist wie umgekehrt (symmetrische Sondenmembranen vorausgesetzt), kann der Verlust von zugesetzter Substanz bei der

Sondenpassage als exaktes Maß der Recovery dienen. Die Methode ist besonders geeignet zur Bestimmung der Wiederfindungsrate exogener Substanzen.

## Anwendungen der Mikrodialyse

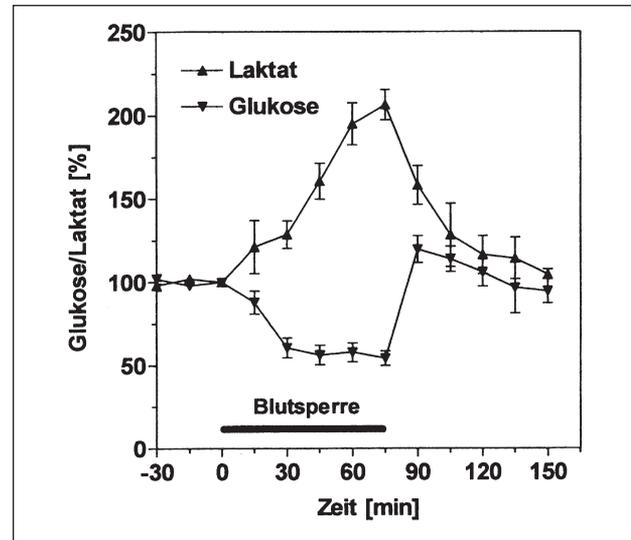
### Untersuchungen in peripheren Geweben

Während Mikrodialysestudien an Versuchstieren seit den siebziger Jahren kontinuierlich zugenommen haben, wurden klinische Anwendungen erst in den neunziger Jahren populär, nachdem Mikrodialysepumpen und vor allem sterile Mikrodialysesonden kommerziell erhältlich wurden, die für den klinischen Gebrauch zugelassen waren<sup>1</sup>. Im folgenden wollen wir exemplarisch einige typische Anwendungsgebiete der Mikrodialysetechnik anführen.

Mikrodialyse ist sehr gut für pharmakokinetische Studien geeignet, um Konzentrations-Zeit-Verläufe von Arzneistoffen im Gewebe zu verfolgen (10). Wiederholt wurden therapierelevante Unterschiede der Gewebe- und Plasmakonzentrationen gefunden, so z.B. bei Untersuchungen der Gewebespiegel von Antibiotika an Probanden (26) oder in Patienten unter intensivmedizinischen Bedingungen; hier imponierten niedrigere Gewebespiegel, aber längere Halbwertszeiten eines Penicillins nach Aortenklappenoperationen (3).

Mikrodialyse eignet sich aber auch zur Messung endogener Substanzen in Haut, Muskel oder Fettgewebe. Untersuchungen im Fettgewebe dienen vor allem zur Charakterisierung des Fett- und Glukosestoffwechsels und werden vor allem von diabetologischen und sportmedizinischen Instituten vorangetrieben (22). Hierbei wurde beispielsweise gefunden, daß die gestörte Homöostase des Glukosestoffwechsels in einer vermehrten peripheren Insulinresistenz des Fettgewebes begründet ist (4). Veränderungen der Gewebespiegel von Glycerol werden z.B. als Indikator adrenalin- bzw. stressinduzierter Lipolyse während operativer Eingriffe verfolgt (12). Mikrodialyse als minimal-invasives Verfahren findet bereits auch in der Pädiatrie und Neonatologie Anwendung zum kontinuierlichen Monitoring der Glukosespiegel der Patienten (15). Dermatologische Arbeitsgruppen verfolgen mittels Mikrodialyse die Freisetzung von Histamin auf verschiedene Noxen; u.a. wurde der Einfluß von Nervenblockaden auf die PAF (Platelet-activating-factor)-induzierte Histaminfreisetzung aus Mastzellen in vivo untersucht (29). Auch in der Schmerzforschung wird die Mikrodialyse als Verfahren eingesetzt, um biochemische Vorgänge der Schmerzentstehung (z.B. die Bildung von Mediatoren) am Menschen in vivo zu erforschen (11, 13).

Die Mikrozirkulation ist der Forschungsschwerpunkt des Instituts für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Mannheim. In einer ersten Anwendung der klinischen Mikrodialyse untersuchten die Autoren die Auswirkungen von Operationen in Blutsperrung (Tourniquet mit 280 mm Hg) oder Blutleere (Hochlagern und Auswickeln der Extremität mit an-



**Abbildung 4:** Konzentrationsverläufe von Glukose und Laktat im M. quadriceps von Patienten während einer Operation in Blutsperrung (Ischämiezeit 75 Minuten) mit anschließender Reperfusion. Mikrodialysesonde: CMA/60 (CMA Microdialysis, Stockholm, Schweden). Die Daten sind als Mittelwerte (N = 6) ± SEM der prozentualen Veränderung der Metabolitenkonzentrationen zu den vorher ermittelten Basalwerten angegeben. Daten modifiziert aus Korth et al., 2000, (21).

schließendem Tourniquet von 280 mm Hg) auf den Energiestoffwechsel des menschlichen Skelettmuskels (21). Entgegen vorherigen Untersuchungen über metabolische Effekte eines Tourniquets, deren Ergebnisse aus Analysen von Blutproben gewonnen wurden, konnten wir zeigen, daß Veränderungen der Glukose- und Laktatspiegel im Gewebe erst 45 Minuten nach Öffnen des Tourniquets wieder die Ausgangslage erreichen (Abb. 4). Die Messungen, die auch Analysen von Hypoxanthin und Cholin als Abbauprodukte von ATP und Zellmembranlipiden umfassten, offenbarten auch eine signifikant stärkere Beeinträchtigung des Gewebestoffwechsels nach Blutleere, verglichen zur Blutsperrung. Für Glukose ließen sich diese Veränderungen nur in der mittels Mikrodialyse gewonnenen Interstitialflüssigkeit, nicht aber in Blutproben aus der V. femoralis nachweisen (21). Da die Mikrodialysesonden rasch nach Einleitung der Spinalanästhesie in die Muskeln plaziert werden konnten, empfanden weder die Patienten noch das operative Personal die Studie als belastend. Unsere aktuellen Arbeiten sind darauf gerichtet, Veränderungen von Metaboliten unter Reanimationsbedingungen in verschiedenen Organen im Großtiermodell (Schweine) zu charakterisieren. Der Darm als Schockorgan ist ein weiterer Einsatzort der Mikrodialysetechnik in unserem Institut (Korth et al., unveröffentlichte Daten).

<sup>1</sup> Eine Sammlung von Literaturzitaten zur klinischen Mikrodialyse bietet die Bibliographie der Fa. CMA unter der Internetadresse [www.microdialysis.se](http://www.microdialysis.se).

### Anwendungen im Gehirn

Wie bereits erwähnt, stammt die Mikrodialyse ursprünglich aus den Neurowissenschaften und wurde besonders häufig angewendet, um Veränderungen der Transmitterfreisetzung im Gehirn zu verfolgen; zu dieser Anwendung erscheinen heute jährlich mehrere hundert Arbeiten. Exemplarisch seien einige typische Anwendungen aufgeführt. So beschäftigt sich die Mainzer Arbeitsgruppe in tierexperimentellen Projekten mit der Untersuchung zentraler cholinergischer Mechanismen, die große Bedeutung für Lern- und Gedächtnisvorgänge haben und u.a. bei der Alzheimerschen Demenz pathologisch verändert sind. Wir haben uns auf die Freisetzung von Acetylcholin in der septohippokampalen Bahn spezialisiert und Einflüsse von Nährstoffen (Glucose, Cholin, Nikotinamid), toxischen Prinzipien (Ethanol) und potentiellen Wirkstoffen (z.B. Esterasehemmer) analysiert (14, 20). Für diese Untersuchungen ist es wichtig, daß die Untersuchungen an wachen, sich frei bewegenden Tieren durchgeführt werden konnten, da das cholinerge System auf Narkotika sehr empfindlich reagiert; hierbei ist auch die Messung neuronaler Aktivität möglich, während das Tier bestimmte Verhaltensweisen, z.B. in Lerntests, ausführt (Klein, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus verwenden wir Messungen der Cholinfreisetzung als Maß für pathologischen Membranabbau, z.B. unter dem Einfluß von Hypoxie und glutamaterger Übererregung (20, 36).

Prinzipiell können alle Neurotransmitter mittels Mikrodialyse bestimmt werden; vor allem aminerge Transmitter (Dopamin, Noradrenalin) und Aminosäuren (Glutamat, GABA) und ihre Bedeutung bei neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern wurden in tierexperimentellen Studien intensiv erforscht. Diese Anwendungen haben in den letzten zehn Jahren, wenn auch zögerlich, Eingang in die Klinik gefunden. Erstmals 1989 wurden intraoperativ Mikrodialysesonden ins Gehirn von Parkinson-Patienten implantiert, und zwar in Gewebe, das anschließend bei einer Thalamotomie entfernt wurde (24). Diese Daten zeigten erstmals, daß die EZF des Gehirns lebender Menschen in seiner Zusammensetzung weitgehend der EZF von typischen Versuchstieren (Ratten, Kaninchen) entspricht. Heute findet die Mikrodialyse im menschlichen Gehirn in zahlreichen klinischen Projekten Anwendung. In der Epileptologie z.B. wurde die Mikrodialyse zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von Antiepileptika (33), aber auch zur Erforschung des Energiestoffwechsels (8) sowie grundlegender Veränderungen GABAerger Mechanismen bei Temporallappenepilepsie (9) genutzt. Anstiege von Glutamat im EZR wurden bei Epilepsie (7), Schlaganfall (18) und Schädel-Hirn-Traumen (28) beobachtet.

Metabolite des Energiestoffwechsels sowie die extrazellulären Glutamatspiegel stehen auch bei Anwendungen der Mikrodialyse im Rahmen der intensivmedizinischen Betreuung bei Schädel-Hirn-Traumen und subarachnoidalen Blutungen im Mittelpunkt des Interesses. Dabei wird zur Detektion zerebraler

Ischämien ein "multimodales Monitoring" angestrebt: neben der kontinuierlichen Aufzeichnung der hämodynamischen Parameter, der Gewebeoxygenierung und des intrakraniellen Druckes werden die Dialysate gesammelt und direkt am Krankenbett analysiert. Zusätzlich nimmt eine Videokamera alle Aktivitäten am Patientenbett auf, um Korrelationen beispielsweise von Blutdruckanstiegen und metabolischen Veränderungen mit pflegerischen Maßnahmen, Krampfanfällen o.ä. zu erleichtern (28, 23). Dabei sei angemerkt, daß die Implantation einer Sonde direkt in die Penumbra des geschädigten Gewebes (wie in schwedischen Arbeiten üblich) metabolische Veränderungen frühzeitig erkennen läßt als die sonst übliche Praxis, Sonden frontal in nicht betroffene Hirnareale einzulegen, die dann als metabolische Indikatoren erst bei einer generalisierten Hirndruckzunahme pathologische Werte liefern werden.

Zusammenfassend belegen die bisherigen Erfahrungen mit der Mikrodialyse, daß das Verfahren unter Beachtung der o.g. methodischen Kautelen sehr gut geeignet ist, um sehr variable Fragestellungen sowohl tierexperimentell als auch klinisch in vivo zu untersuchen. Eine weitere Zunahme der Verwendung der Mikrodialysetechnik in der interdisziplinären anästhesiologischen Forschung, sei es unter pharmakologischen oder metabolischen Aspekten, ist in naher Zukunft zu erwarten.

**Summary: Microdialysis is a minimally invasive procedure for the continuous sampling of diffusible, water-soluble substances from the extracellular space of various tissues. The availability of microdialysis probes and pumps which are licensed for use in humans and advances in chemical analysis have contributed in recent years to the popularity of this method in clinical research. The present article discusses the potential and the limits of this technique and highlights examples of successful applications in medical research.**

**Key-words:**  
**Microdialysis;**  
**Metabolism;**  
**Extracellular space.**

### Literatur

1. Benveniste H, Hüttemeier PC: Microdialysis – theory and application. *Prog Neurobiol* 35 (1990) 195-219
2. Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N: The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem* 13 (1966) 1057-67
3. Brunner M, Pernerstorfer T, Mayer BX, Eicher HG, Müller M: Surgery and intensive care procedures affect the target site distribution of piperacillin. *Crit Care Med* 28 (2000) 1754-59
4. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundsal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI: Impaired glucose transport as a cause of decreased insu-

- lin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341 (1999) 248-57
5. *De Lange ECM, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD*: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res* 25 (1997) 27-49
  6. *Delgado JMR, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM*: Dialytrode for long term intercerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn* 198 (1972) 9-21
  7. *During MJ, Spencer DD*: Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993, 341: 1607-10
  8. *During MJ, Fried I, Leone P, Katz A, Spencer DD*: Direct measurement of extracellular lactate in the human hippocampus during spontaneous seizures. *J Neurochem* 62 (1994) 2356-61
  9. *During MJ, Ryder KM, Spencer DD*: Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* 376 (1995) 174-177
  10. *Elmqvist WF, Sawchuk RJ*: Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 14 (1997) 267-288
  11. *Ernberg M, Hedenberg-Magnusson B, Alstergen P, Kopp S*: The level of serotonin in the superficial masseter muscle in relation to local pain and allodynia. *Life Sci* 65 (1999) 313-25
  12. *Felländer G, Nordenström J, Tjäder I, Bolinder J, Arner P*: Lipolysis during abdominal surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 78 (1994) 150-155
  13. *Gravennilsen T, McArdle A, Phoenix J, Arendtnielsen L, Jensen TS, Jackson MJ, Edwards RHT*: In vivo model of muscle pain – quantification of intramuscular chemical, electrical and pressure changes associated with saline-induced muscle pain in humans. *Pain* 69 (1997) 137-43
  14. *Henn C, Löffelholz K, Klein J*: Stimulatory and inhibitory effects of ethanol on hippocampal acetylcholine release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357 (1998) 640-647
  15. *Hildingsson U, Longqvist PA, Sellden H, Eksborg S, Ungerstedt U, Marcus C*: Age-dependent variations in white adipose tissue glycerol and lactate production after surgery measured by microdialysis in neonates and children. *Paediatr Anaesth* 10 (2000) 283-289
  16. *Hsiao J K, Ball B A, Morrison P F, Mefford I N, Bungay P M*: Effects of different semipermeable membranes on in vitro and in vivo performance of microdialysis probes. *J Neurochem* 54 (1990) 1449-52
  17. *Jacobson I, Sandberg M, Hamberger A*: Mass transfer in brain dialysis device: a new method for estimation of extracellular amino acids concentration. *J Neurosci Methods* 15 (1985) 263-268
  18. *Kanthan R, Shuaib A, Griebel R, Miyashita H*: Intracerebral human microdialysis: in vivo study of an acute focal ischemic model of the human brain. *Stroke* 26 (1995) 870-873
  19. *Klein J*: Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm* 107 (2000) 1027-63
  20. *Köppen A, Klein J, Erb C, Löffelholz K*: Acetylcholine release and choline availability in rat hippocampus: effects of exogenous choline and nicotinamide. *J Pharmacol Exp Ther* 282 (1997) 1139-45
  21. *Korth U, Merkel G, Fernandez FF, Jandewerth O, Dogan G, Koch T, van Ackern K, Weichel O, Klein J*: Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology* 93 (2000) 1407-1412
  22. *Lafontan M, Arner P*: Application of in situ microdialysis to measure metabolic and vascular responses in adipose tissue. *Trends Pharmacol Sci* 17 (1996) 309-313
  23. *Landolt H, Langemann H, Alessandri B*: A concept for the introduction of cerebral microdialysis in neurointensive care. *Acta Neurochir* 67 [Suppl.] (1996) 31-36
  24. *Meyerson B, Linderoth B, Karlsson H, Ungerstedt U*: Microdialysis in the human brain: extracellular measurement in the thalamus of parkinsonian patients. *Life Sci* 46 (1989) 301-308
  25. *Moroni F, Pepeu G*: The cortical cup technique. In: *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo*, S. 63-81. (CA Marsden, Hrsg.). Wiley: New York, 1984
  26. *Müller M, Schmid R, Georgopoulos A, Buxbaum A, Wasicek C, Eichler HG*: Application of microdialysis to clinical pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther* 57 (1995) 371-380
  27. *Parsons LH, Justice JB Jr.*: Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis. *Crit Rev Neurobiol* 8 (1994) 189-220
  28. *Persson L, Hillered L*: Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis. *J Neurosurg* 76 (1992) 72-80
  29. *Petersen LJ, Church MK, Skov PS*: Platelet-activating factor induces histamine release from human skin mast cells in vivo, which is reduced by local nerve blockade. *Clin Exp Allergy* 27 (1997) 284-295
  30. *Philippou A*: Use of push-pull cannulae to determine the release of endogenous neurotransmitters in distinct brain areas of anesthetized and freely moving animals. In: *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo*, S. 3-39. (CA Marsden, Hrsg.). Wiley: New York, 1984
  31. *Rosdahl L, Ungerstedt U, Henriksson J*: Microdialysis in human skeletal muscle and adipose tissue at low flow rates is possible if dextran-70 is added to prevent loss of perfusion fluid. *Acta Physiol Scand* 159 (1997) 261-262
  32. *Santiago M, Westerink BHC*: Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342 (1990) 407-414
  33. *Scheyer RD, During MJ, Spencer DD, Cramer JA, Mattson RH*: Measurement of carbamazepine and carbamazepine epoxide in the human brain using in vivo microdialysis. *Neurology* 44 (1994) 1469-72
  34. *Ungerstedt U, Pycock C.*: Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 1278 (1974) 1-13
  35. *Ungerstedt U.*: Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In: *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo*, S. 81-105. (CA Marsden, Hrsg.). Wiley: New York, 1984
  36. *Weichel O, Hilgert M, Chatterjee SS, Lehr M, Klein J*: Bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba, inhibits NMDA-induced phospholipase A2 activation and phospholipid breakdown in rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360 (1999) 609-615.

**Korrespondenzadresse:**

Dr. med. *Ulrike Korth*  
 Institut für Anästhesiologie und  
 Operative Intensivmedizin  
 Universitätsklinikum Mannheim  
 Theodor-Kutzer-Ufer 1 - 3  
 D-68167 Mannheim.