

2 MATERIAL UND METHODEN

Die vorliegende experimentelle Untersuchung verschiedener Tokolytika am humanen Myometrium *in vitro* führten wir im Labor der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Deutschland, durch.

Die Untersuchungen am humanen Myometrium wurde im Zeitraum von März 2000 bis März 2002 ausgeführt.

Das Design der vorliegenden Studie wurde von der Ethik-Kommission der Charité genehmigt, Antragsnummer 141/2002.

2.1 Die Geräte

Geräte für den Versuchsaufbau

- Sechs Organbäder nach Schuller
- Thermostat D1, Fa. Thermo Haake; Karlsruhe (D)
- 372 F 30 Force Transducer, Fa. Hugo Sachs Elektronik; March-Hugstetten (D)

Geräte für Herstellung der Krebs-Henseleit-Lösung

- Laborwaage, SAC51, Fa. Scaltec; Göttingen (D)
- pH-Meter 766 Calimatic, Fa. Knick; Berlin (D)

Geräte für die Myometriumpreparation

- Stereolupe, Highlight 3000, Fa. Olympus® Europe; Hamburg (D)

Geräte für die Aufbereitung von pharmakologischen Substanzen

- Gelblichtquelle, Type App. Nr. 5412, Fa. PTW Dr. Psychlau GmbH; Freiburg (D)
- Vortex, Typ REAX 1DR, Fa. Heidolph; Schwabach (D)
- Universal-Kühlautomat FKS 3600 10 A, Fa. Liebherr; Biberach (D)
- Ultra Low Freezer, U 57085; Fa. New Brunswick Scientific GmbH; Nürtingen (D)

Computer und Programme

- PC Scenic Pro C5, Fa. Fujitsu Siemens Computers GmbH; München (D)
- PC Pentium II, Intel; Santa Clara (USA)
- UterData®, ITERATION Informatik Technologien GmbH; Wetzlar (D)
- SPSS 10.0®, SPSS Inc.; Chicago (USA)
- Reference Manager 10®, Thomson ISI Research software; Stamford (USA)

Das Organbad

Die entscheidenden Bestandteile der für dieses Experiment verwendeten Apparatur sind sechs gläserne Organbäder. Sie bilden ein System, welches eine möglichst physiologische Umgebung für das Myometriumgewebe herstellt. Umgebungstemperatur, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt sowie Nährflüssigkeit mit einem pH-Wert von $7,5 \pm 0,5$ müssen genau auf die Bedürfnisse des Myometriumgewebes abgestimmt werden (siehe schematische Darstellung, Abbildung 7).



Abbildung 6: Photo der Apparatur

Jedes Organbad besteht aus doppelwandigem Glas mit drei verschiedenen Zu- und Ablaufsystemen. Ein System ist für die Nährlösung, ein zweites für die Gaszufuhr und ein drittes für die Temperaturregelung bestimmt.

Die innere Glaswand des Organbads umgibt das zentrale Bad mit einem Fassungsvermögen von ca. 12 ml. Es ist nach oben hin offen, so dass zum einen der Aufhängeapparat für die Myometriumstreifen in das Bad herabgelassen werden kann, zum anderen die Nährlösung (eine modifizierte Krebs-Henseleit Lösung) für die

Myometriumbstreifen wie auch die zu testenden Substanzen hinein pipettiert werden können. An der Seitenwand des unteren Pols des zentralen Bades gibt es eine Ablassvorrichtung für die Nährlösung.

Das zentrale Bad wird nach unten durch eine Fritte abgeteilt, durch welches Carbogengas (95% O₂, 5% CO₂) zur Ventilation der Myometriumbstreifen zugeführt wird. Die einströmende Gasmenge kann durch einen zwischengeschalteten Hahn fein reguliert werden.

Ein Umlaufsystem zur Temperaturregulierung des zentralen Bades wird durch die innere und äußere Glaswand begrenzt. Am unteren Pol des Organbades gibt es hierfür einen Zulauf, am oberen Pol einen Abfluss, die jeweils durch Kunststoffschläuche mit einem Thermostat verbunden sind. Es handelt sich um ein thermostatreguliertes Wasserbad mit integrierter Pumpe. Sie bilden zusammen ein in sich abgeschlossenes System, das einen stetig zirkulierenden Wasserumlauf (destilliertes Wasser) bei einer Temperatur von 37°C gewährleistet.

Aufhängeapparat und Kraftaufnehmer

Über jedem Organbad ist an dem oberen Abschnitt des Holzgestells ein Aufhängeapparat für die Myometriumbstreifen angebracht. Auf diese Weise kann ein Myometriumbstreifen erst eingehängt und dann in das Organbad hinab gelassen werden. Der Myometriumbstreifen hängt vertikal und wird nur durch zwei Metallklammern an seinem unteren und oberen Ende gehalten. Die Metallklammern bestehen aus zwei beweglichen Schenkeln, die ähnlich einer Pinzette aufgespreizt

werden können und den Muskelstreifen schonend und ohne Manipulation halten.

Die untere Klammer ist feststehend an einem langen L-förmigen Stab befestigt, der als ein Teil des Aufhängeapparates nach unten ragte. Die obere Klammer hängt an einem dünnen Kunststofffaden, der an einem Kraftaufnehmer befestigt ist. Der Kraftaufnehmer ist ein Teil des Aufhängeapparates. An ihm können durch Justierschrauben die Spannung in dem Kunststofffaden und damit die Spannung im Muskelstreifen reguliert werden.

Datenerfassungssystem

Im Kraftaufnehmer liegen die Schnittstellen, welche die isometrischen Kontraktionen des Myometriums in elektronische Daten umsetzen. Er registriert das Kontraktionsverhalten der Muskelstreifen. Sämtliche vertikale Bewegungsveränderungen sowie Phasen gleicher anhaltender Spannung werden erfasst. Die Messwerte der sechs Transducer werden über ein Feldbussystem mittels einer seriellen Schnittstelle vom Computer in Intervallen von einer Sekunde abgefragt. Diese Ausgangssignale werden über einen Brückenverstärker potenziert und mit einer A-D-Wandlerkarte über das MS-Windows-basierte Programm UterData[®] auf einen Computer gespeichert. Dieses Programm registriert die Zugkraft der einzelnen Muskelstreifen und setzt sie in ein Kraft-Zeit-Diagramm um. Die Kraft-Zeit-Diagramme werden synchron zum Versuch auf dem PC-Monitor angezeigt. Somit kann der Ablauf des Versuches verfolgt werden. An den Messkurven kann der Zustand der Myometriumstreifen und der Erfolg der Versuche beurteilt werden.

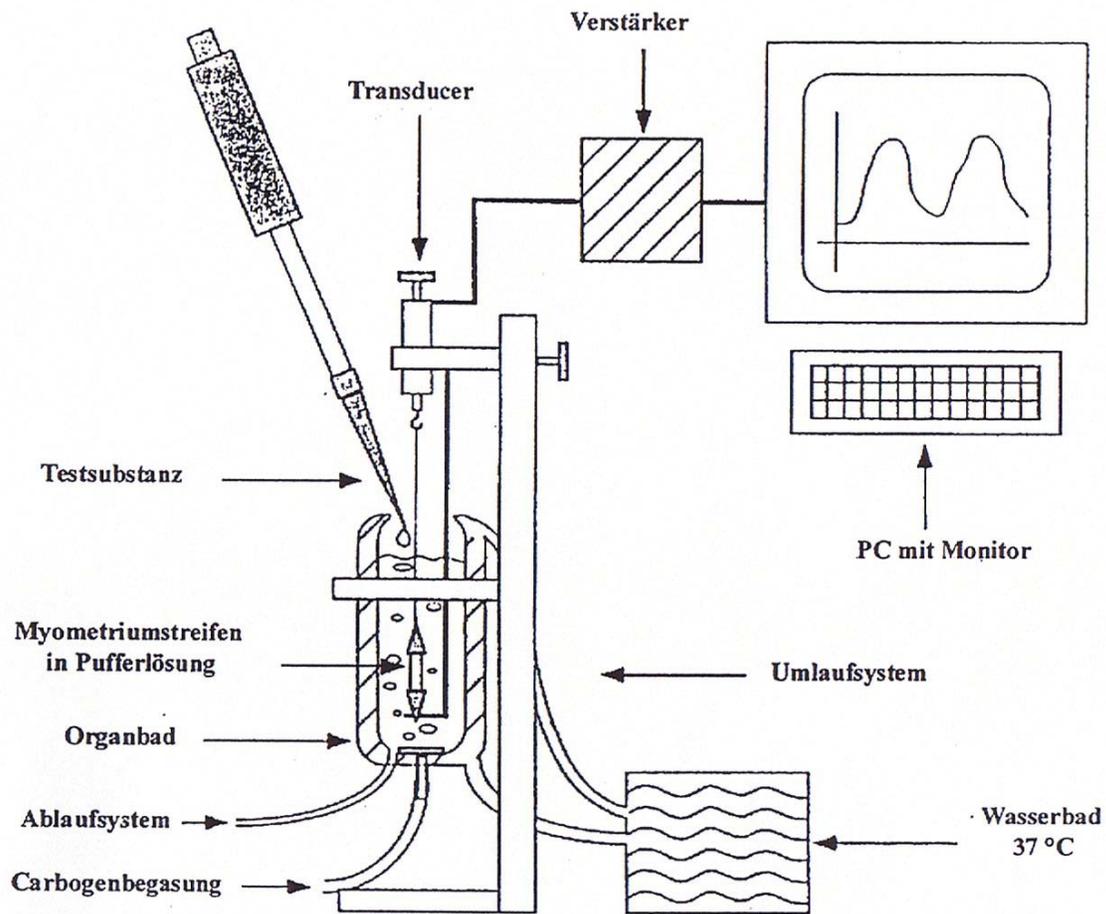


Abbildung 7: Versuchsaufbau

2.2 Die Myometriumprobe

2.2.1 Aufklärung der Patientinnen

Das für den Versuch verwendete Myometriumgewebe wurde von gesunden Schwangeren bei primären Kaiserschnitten gewonnen. Die Schwangeren waren alle Patientinnen der Klinik für Geburtsmedizin der Charité am Campus Virchow Klinikum.

Als Einschlusskriterien für die Teilnahme an dem Versuch galten:

- Volljährigkeit
- Schwangerschaftsdauer über 34 Wochen
- primäre Sectio
- Unterzeichnung der Patientinneneinwilligung

Zum Ausschluss führten folgende Kriterien:

- sekundäre Sectiones
- Amnioninfektionssyndrom oder bestehende Infektionskrankheiten wie HIV, HBV
- Nicht gegebene Geschäftsfähigkeit oder Bewusstseinsintrübung der Patientin.

Die Schwangere wurde mindestens 24 Stunden vor der geplanten Entbindung durch einen Arzt oder eine Ärztin mündlich über die gewünschte Probeentnahme aufgeklärt und sie willigte schriftlich ein (Patientinnen Aufklärung und Einwilligung siehe Anhang).

Gewinnung der Myometriumprobe

Die Myometriumprobe wurde bei primären Sectiones caesareae gewonnen. Nach der Entwicklung des Kindes und der Lösung der Plazenta, wurde, nachdem das Nähen der lateralen Wundränder erfolgt war, durch den Operateur vom oberen Rand der Uteruswunde eine Gewebeprobe entnommen. Diese Gewebeprobe war ca. 2x2x2 cm groß und wurde sofort in ein bereitstehendes Probengefäß mit 0.9 % Ringer Lösung bei 4°C gelegt.

Das Entnehmen der Probe führte zu keiner wesentlichen Verlängerung der Operationszeit oder einer vermehrten Blutung, keiner wesentlichen Vergrößerung der Operationswunde und zu keiner Verschlechterung der Wund- und Narbenverhältnisse.

Nach der Entnahme wurde das Gewebe zweimal mit gekühlter Ringerlösung gespült und von Blutresten befreit. Die Gewebeprobe wurde innerhalb von 20 Stunden verarbeitet.

Gewebepräparation

Das Myometriumgewebe wurde für die Versuchsdurchführung präpariert. Dazu wurde das Gewebe in eine Schale mit Gummieinlage mit vorgewärmter Nährlösung gelegt und mit Nadeln fixiert. Unter einer Stereolupe wurden aus der Myometriumprobe mittels einer Präparierschere und anatomischen Pinzetten in Längsrichtung der Muskelfasern sechs Streifen von 2x2x10mm Größe abgetrennt.

Aufhängung der Myometriumstreifen in die Versuchsvorrichtung

Die zu untersuchenden Myometriumstreifen wurden jeweils an einem der sechs Aufhängeapparate befestigt. Der Aufhängeapparat mit den fixierten Streifen wurde nun mit Hilfe von kleinen Schrauben vertikal in das Organbad abgesenkt. Mittels der Justierschrauben am Kraftaufnehmer konnten die Myometriumstreifen gespannt werden.

2.3 Die Substanzen

2.3.1 Pharmakologische Substanzen

- Oxytocin, Syntocinon[®], 3 I.E./ml, Fa. Novartis Pharma; Zürich (Ch)
- Atosiban, Tractocile[®], 7,5 mg/ml, Fa. Ferring AB; Kiel (D)
- Nifedipin, Adalat[®] pro infusione, 5 mg/50 ml, Fa. Bayer; Leverkusen (D)
- Fenoterolhydrobromid, Partusisten[®] intrapartal, 25 µg/ml, Fa. Boehringer Ingelheim (D)

Oxytocin

Zur Oxytocinstimulation der Myometriummuskel wurde Syntocinon[®] von der Firma Novartis verwendet, das pro ml 3 I.E. Oxytocin enthält.

Mit destilliertem Wasser wurde eine Verdünnung im Verhältnis von 1:30 vorgenommen. Zur Stimulation der Myometriumstreifen wurde eine Menge von 100 µl dieser Lösung den 10 ml Nährlösung des Organbads hinzugefügt. So ergab sich im Organbad eine Oxytocin-Konzentration von 1 I.E./l.

Atosiban

Als Oxytocin-Antagonist wurde Atosiban, Tractocile[®] von der Firma Ferring AB, in der Konzentration von 7,5 mg/ml, verwendet.

Nach dem Therapie-Schema des Herstellers Ferring [36] werden Infusionen von 300 µg/min Atosiban empfohlen. *In vivo* werden innerhalb von einer Stunde Steady-state-

Plasmakonzentration von 442 ± 73 ng/ml im Mittelwert (Bereich 298 bis 533 ng/ml) erreicht[37]. Davon ausgehend, wurden für die Versuchsreihe Konzentrationen von Atosiban in Höhe 250 ng/ml (entspricht $2,5 \times 10^{-7}$ M), 500 ng/ml (5×10^{-7} M) und 1000 ng/ml (1×10^{-6} M) verwendet.

Nifedipin

Das für die Versuchsreihe verwendete Nifedipin, Adalat Infusion[®], kam von der Firma Bayer. Eine Ampulle von 50 ml enthält 5 mg Nifedipin.

In einer Untersuchung zu therapeutischen Plasmakonzentrationen von Nifedipin bei schwangeren Frauen wurden nach Gabe von 10mg Nifedipin sublingual durchschnittliche Peak-Serum Konzentration von 97 µg/L (23.4 bis 197.9 µg/L) erreicht. Nach oraler Einnahme von 10 mg Nifedipin lagen die Peak-Serum Konzentrationen bei $38,6 \pm 18$ µg/L nach 40 Minuten. Nach 6 Stunden nach der letzten oralen Dosis, lagen die Konzentrationen zwischen 1,5 und 21 µg/L (Durchschnitt 7,2 µg/L) [47].

Von der Firma Bayer wurden maximale Plasmakonzentrationen für oral eingenommene 10 mg Kapseln C_{max} von 65 bis 100 µg/L und für 10 mg Tabletten (Adalat[®]T10) Plasmakonzentrationen von C_{max} 65 µg/L angegeben [68].

Basierend auf den ermittelten therapeutischen Plasmakonzentrationen wurden für die Versuchsreihe Nifedipinkonzentrationen von 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml verwendet. Dies entspricht mol Konzentrationen von Nifedipin $10 \text{ ng/ml} = 2,9 \times 10^{-8}$ M; Nifedipin $50 \text{ ng/ml} = 1,5 \times 10^{-7}$ M; Nifedipin $100 \text{ ng/ml} = 2,9 \times 10^{-7}$ M.

Für die Durchführung der Versuchsreihe musste die Lichtempfindlichkeit von Nifedipin berücksichtigt werden. Die Lagerung des abgefüllten Nifedipins erfolgte bei minus 80°C.

Fenoterol

Das Fenoterol stammte von der Firma Boehringer Ingelheim. Es wurde Partusisten[®] intrapartal, in einer Konzentration von 25 µg/ml Fenoterolhydrobromid verwendet.

Bei einer intravenösen Infusion von 2 µg/min Fenoterol stellt sich ein Steady-state-Plasmaspiegel von 100 pg/ml ein. Bei oraler Anwendung von 5 mg Fenoterol im 3-Stunden-Intervall erreicht der Steady-state-Plasmaspiegel 210 pg/ml und ist mit dem einer Fenoterol-Infusion von 0,5 µg/min nahezu äquivalent. Die uterusrelaxierende Wirkung setzt bei einem Plasmaspiegel von 200 pg/ml ein [58]. Für die Versuchsreihe wurden Konzentrationen um den therapeutischen Plasmaspiegel gewählt: 500 pg/ml, 1000 pg/ml und 2000 pg/ml. Die mol Konzentrationen liegen entsprechend für Fenoterol 500 pg/ml bei $1,65 \times 10^{-9} \text{M}$; Fenoterol 1000 pg/ml = $3,3 \times 10^{-9} \text{M}$ und Fenoterol 2000 pg/ml = $6,6 \times 10^{-9} \text{M}$.

2.3.2 Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung

- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethanesulfonsäure 99% (HEPES), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (USA)
- 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonsäure (HEPES), Fa. Fluka; Buchs, (D)
- Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Fa. Merck; Darmstadt (D)
- D(+)-Glucose, wasserfrei, Fa. Merck; Darmstadt (D)
- Kaliumchlorid (KCl), Fa. Merck; Darmstadt (D)
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Fa. Merck; Darmstadt (D)
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Fa. Merck; Darmstadt (D)
- Natriumchlorid (NaCl), Fa. Merck; Darmstadt (D)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Fa. Merck; Darmstadt (D)
- Pyruvic Acid (α -Ketopropionic acid) Sodium Salt, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (USA)

Die detaillierte Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung wird in Tabelle 1 beschrieben. Für die optimale Versorgung der Myometriumpuben während der Versuche wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung als Nähr- und Spüllösung verwendet mit einem angestrebten pH-Wert von $7.4 \pm 0,05$.

2.3.3 Weitere Substanzen

- Ringerlösung, Ecotainer[®], Fa. B Braun Melsungen AG (D)
- 5 % Carbogengas in Sauerstoff, AGA Gas GmbH; Hamburg (D)
- Verdünnte Salzsäure 10% (zur Reinigen der Organbadgefäße), selbst hergestellt
- Bad Stabil, neoLab[®], neoLab, Laborbedarf-Vertriebs GmbH; Heidelberg (D)

Stammlösungen; Substanzen jeweils in 100ml destilliertem Wasser gelöst		Menge	mmol/l
CaCl₂	14,7 g	5 ml	1.5 mmol/l
KCl	10 g	6 ml	4.0 mmol/l
KH₂PO₄	10 g	3,26 ml	1.2 mmol/l
MgSO₄	20 g	2,9 ml	2.4 mmol/l

Feste Substanzen		Menge	mmol/l
HEPES		2,8 g	5.9 mmol/l
Glucose		3,6 g	10,0 mmol/l
NaCl		13,6 g	116 mmol/l
NaHCO₃		4,18 g	24.9 mmol/l
Pyruvat		0,44 g	2.5 mmol/l

Tabelle 1: Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Lösung 2000 ml

2.4 Der Versuch

2.4.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau sah zwei verschiedene Versuchsabläufe vor. Eine Versuchsreihe der Tokolytika-Analyse wurde am Myometriummuskel durchgeführt, dessen Kontraktionen mittels Oxytocingabe stimuliert wurde. Die andere Versuchsreihe erfolgte ohne Vorstimulierung am spontan kontrahierenden Myometriummuskel.

2.4.2 Versuchsdurchführung

Ein präparierter Myometriumstreifen wurde, wie oben beschrieben (siehe Seite 37), zwischen den Metallklammern des Aufhängeapparates fixiert, in das Organbad mit Nährlösung eingelassen und dann auf 20 mN gespannt.

Die Spannung im Muskelstreifen lockerte sich in der Regel schnell. Sie wurden zwei Mal innerhalb von wenigen Sekunden nach dem ersten Spannen auf 20 mN nachgespannt. Auf diese Weise wurde mit allen sechs Streifen verfahren. Über Ventile an den Organbädern wurde die Zufuhr von Carbogengas fein reguliert.

Waren die Myometriumstreifen im Aufhängeapparat eingehängt, folgte eine Erholungsphase für den Muskel. Auf dem Kraft-Zeit-Diagramm am Computermonitor war ein typischer Verlauf zu beobachten. Die voreingestellte Spannung von 20 mN verringerte sich stetig, bis sie ein konstantes Niveau zwischen 5 bis 10 mN erreichte. Nach ungefähr einer Stunde setzten die spontanen Kontraktionen des Myometriumsmuskels meist langsam wieder ein.

Während des gesamten Versuches wurde in den Organbädern die Nährlösung regelmäßig durch vorgewärmte Nährlösung ersetzt. Während des ersten Versuchsabschnittes der Erholung und Äquilibration wurde in den Organbädern alle 30 Minuten die Nährlösung erneuert. Mit Beginn der eigentlichen Versuchsreihe wurde für jeden neuen Messschritt zunächst die Nährlösung mit 10 ml in den Organbädern erneuert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen hinzupipettiert. Nach 15 Minuten Messung wurden die Myometriumstreifen in den Organbädern zwei Mal direkt hintereinander mit Nährlösung gespült. In der folgenden

Spül- und Erholungsphase von 60 Minuten wurde die Nährlösung alle 15 Minuten ausgetauscht ohne eine weitere Zugabe einer Test-Substanz in dieser Zeit.

Versuchskriterien

Die Kriterien für eine Versuchsdurchführung an einem Myometriumstreifen waren regelmäßige Kontraktionen größer als 20 mN über eine Stunde (Äquilibrationsphase). Hatten nach 180 Minuten keine spontanen Kontraktionen eingesetzt, wurde der Streifen aus dem Versuch ausgeschlossen.

Versuchsdurchführung unter Oxytocinstimulation

Bei der Versuchsreihe zur Untersuchung der Tokolytika an oxytocinstimulierten Myometriumkontraktionen wurde im Anschluss an die Äquilibrationsphase die Ausgangsaktivität der Kontraktionen unter 1 I.E./l Oxytocin für 15 Minuten gemessen.

Der Effekt der Stimulierung war sofort an den verstärkten Kontraktionen des Myometriums zu sehen (siehe Abbildung 10, Seite 56).

Um das Oxytocin aus den Organbädern auszuwaschen, wurde direkt im Anschluss an den Versuch zweimalig und dann alle 15 Minuten über einen Zeitraum von 60 Minuten mit Nährlösung gespült.

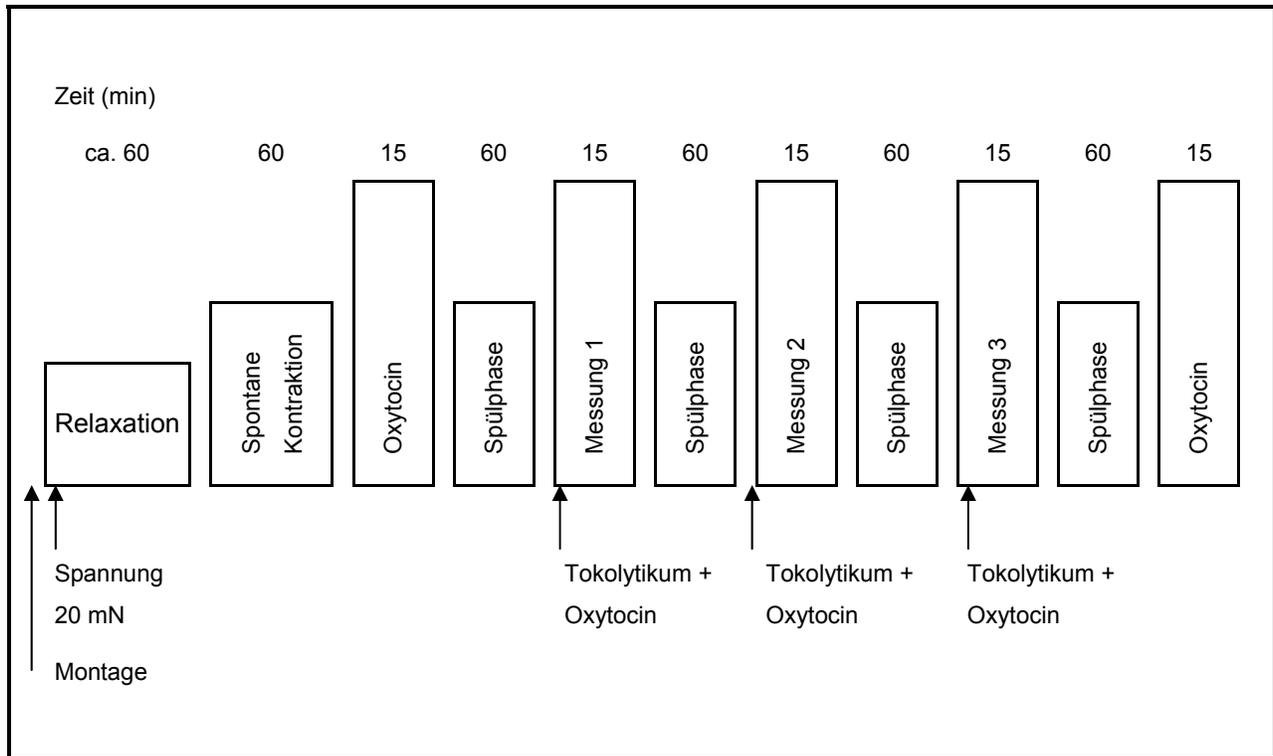


Abbildung 8: Versuchsaufbau für Versuche unter Oxytocinstimulation

Es folgten nun die eigentlichen Versuche mit den Tokolytika Atosiban, Nifedipin und Fenoterol. Es konnten bis zu drei Messungen an einem Myometriumstreifen durchgeführt werden. Nach einem zufälligen Schema wurde dem einzelnen Streifen eine Substanz zugewiesen. Die Substanz wurde in aufsteigender oder gleicher Konzentration am Streifen getestet.

Zur Durchführung der Tokolytika-Messungen erfolgte zunächst ein Nährlösungswechsel mit 10 ml pro Organbad. Das Tokolytikum wurde in das Organbad pipettiert. Direkt im Anschluss wurde 1 I.E./l Oxytocin ebenfalls in das Bad pipettiert. Ab diesem Zeitpunkt begann die Messphase von 15 Minuten. Anschließend erfolgte der gleiche Ablauf des Spülens wie oben erläutert. Auf diese Weise wurden

alle drei Messungen durchgeführt. Zeigte der Muskelstreifen eine zu große Ermüdung bzw. erholte er sich nach einem Versuchsablauf nicht, wurden an ihm keine weiteren Messungen durchgeführt.

Nach der letzten Messung und der 60-minütigen Spülphase wurde die Restaktivität der Myometriumkontraktionen unter reiner Oxytocinzugabe gemessen. Sie diente mit der Ausgangsaktivität als Referenz für die Tokolytika-Messungen (siehe Kapitel 2.5.2, Seite 48).

Versuchsdurchführung unter Spontankontraktionen

Bei dem Ablauf für die Tokolytika-Messungen unter spontanen Kontraktionen wurden im Anschluss an die Äquilibrationsphase für 15 Minuten die Spontankontraktionen der Streifen gemessen. Die Spontanaktivität diente als direkte Referenz zur nachfolgenden Messung. Die Messung der Tokolytika erfolgte ohne Zugabe von Oxytocin. Die Auswahl des Tokolytikums geschah wie bei den Oxytocin-Versuchen nach einem zufälligen Schema. Einem Streifen wurde eine Substanz zugewiesen, die in aufsteigender oder gleich bleibender Konzentration in bis zu drei Messungen untersucht wurde. Nach der Messung wurde der Streifen zweimalig und dann alle 15 Minuten mit Nährlösung gespült. Bei der nächsten Messung wurde erneut erst die Spontankontraktion, dann die Hemmung mit Tokolytika jeweils über 15 Minuten gemessen. So konnten bis zu drei Messungen durchgeführt werden.

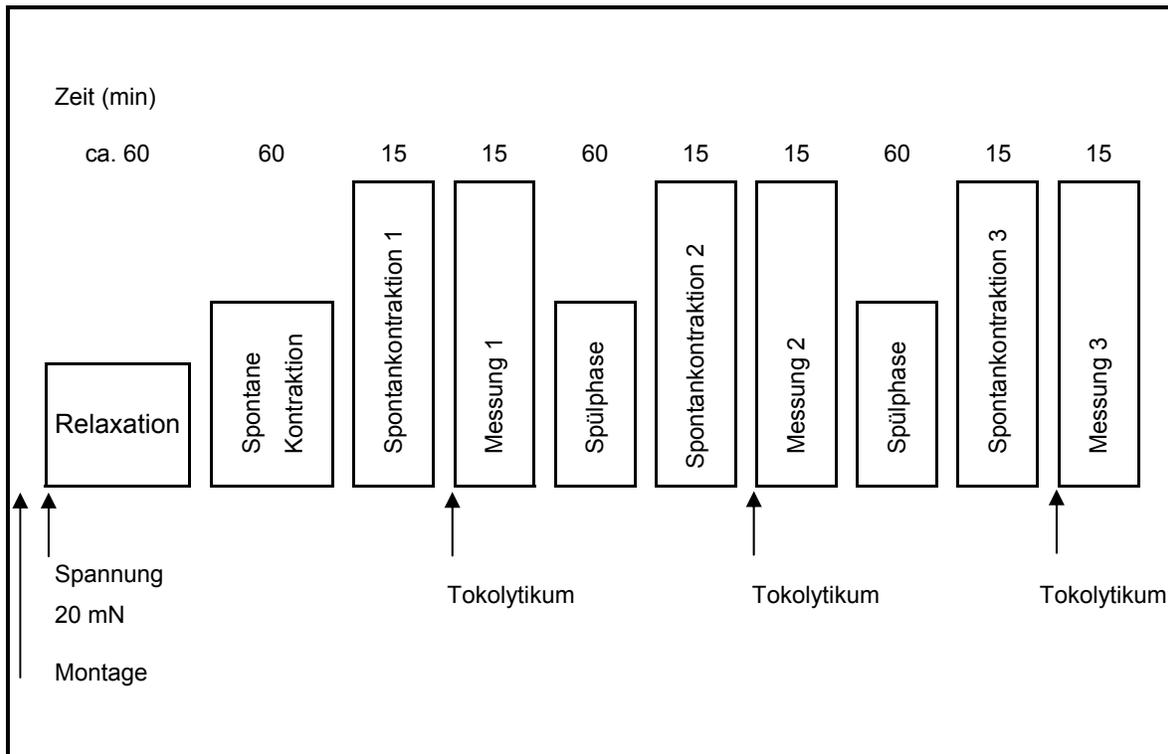


Abbildung 9: Versuchsaufbau für Versuche unter spontanen Kontraktionen

2.5 Die Auswertung

2.5.1 Auswertung Kraft-Zeit-Diagramm

Während des gesamten Versuchsdurchlaufs wurde die Aktivität der Myometriummuskel über das Programm UterData[®] aufgezeichnet. Einmal pro Sekunde wurde die isometrische Kraftentwicklung der einzelnen Muskelstreifen von dem Programm registriert und in ein Kraft-Zeit-Diagramm umgesetzt.

Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC), die in den verschiedenen 15-minütigen Messphasen aufgezeichnet wurde, entsprach dem Maß für die

Kontraktionskraft der Myometriumstreifen. Das Integral ist ein empfindlicher Parameter für die Motilität der Muskelstreifen und beinhaltet Anzahl, Dauer und Amplitude der Kontraktionen, so dass diese nicht getrennt betrachtet werden müssen.

Die Berechnung der Integrale erfolgte über das UterData[®]-Programm durch Addition der einmal pro Sekunde registrierten Werte (in mN x 100) innerhalb der definierten 15-minütigen Messphasen.

2.5.2 Berechnung der Restaktivität

Vor der eigentlichen statistischen Auswertung wurden für die Myometriumproben die Restaktivitäten berechnet.

Um eine Aussage zur Restaktivität der Myometriumkontraktionen nach Zusatz der Substanzen machen zu können, mussten diese in Bezug zu Referenzwerten gesetzt werden. Jeder Streifen diene als seine eigene Kontrolle.

Restaktivitätsberechnung bei Versuchen unter Oxytocinstimulation

Für die Versuchsreihe unter Oxytocinstimulation wurden aus der Ausgangsaktivität und Restaktivität unter Oxytocin für die verschiedenen Messungen Referenzwerte gebildet. Die Berechnung der Referenzen unterschied sich dabei je nach der Anzahl von Versuchen pro Myometriumstreifen. Die unterschiedliche Gewichtung der Referenzen sollte einer eventuellen Ermüdung im Verlaufe des Versuches Rechnung tragen.

Messung pro Streifen	Referenzaktivität (RA)
1 von 1	$RA = (\text{Ausgangsaktivität} + \text{Restaktivität}) \div 2$
1 von 2	$RA = (\text{Ausgangsaktivität} + \text{Ausgangsaktivität} + \text{Restaktivität}) \div 3$
2 von 2	$RA = (\text{Ausgangsaktivität} + \text{Restaktivität} + \text{Restaktivität}) \div 3$
1 von 3	$RA = (\text{Ausgangsaktivität} + \text{Ausgangsaktivität} + \text{Ausgangsaktivität} + \text{Restaktivität}) \div 4$
2 von 3	$RA = (\text{Ausgangsaktivität} + \text{Restaktivität}) \div 2$
3 von 3	$RA = (\text{Ausgangsaktivität} + \text{Ausgangsaktivität} + \text{Restaktivität} + \text{Restaktivität}) \div 4$

Zur Berechnung der Restaktivität der Myometriumkontraktionen nach Zugabe der Substanz wurden die errechneten Referenzaktivitäten äquivalent mit 100% gesehen und mit den jeweiligen Messungen in Bezug gesetzt.

$$\text{Restkontraktion \%} = (\text{Integral der Messung} \times 100) \div \text{Integral Referenzaktivität}$$

Restaktivitätsberechnung bei Versuchen unter Spontankontraktionen

Bei Versuchen unter spontanen Kontraktionen diene als Referenz zur Berechnung der Restkontraktionen die jeweils unmittelbar zuvor gemessenen 15 Minuten Spontankontraktionen.

$$\text{Restkontraktion \%} = (\text{Integral Messung} \times 100) \div \text{Integral Spontankontraktion}$$

2.5.3 Statistische Auswertung

Wir werteten die Daten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS[®] für Windows 11.0 aus. Da es sich bei den untersuchten Parametern durchweg nicht um normal verteilte Parameter handelte, wurden die Medianwerte angegeben sowie die Quartilen. Die Prüfung der Medianunterschiede bei stetigen Variablen erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Prüfung der Häufigkeitsunterschiede bei diskreten Parametern erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Testes. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) bezeichneten wir als signifikant.

2.5.4 Korrektur des Versuchskonzeptes

Das ursprüngliche Versuchskonzept sah vor, dass Versuchsdaten, die in den ersten 10 Stunden (Gruppe A) und die zwischen der 10. bis 20. Stunden (Gruppe B) erhoben wurden, als gleichwertig betrachtet und somit in einen gemeinsamen Datenpool zusammengefasst werden könnten. Die Prüfung der Versuchsdaten zeigte bei Versuchen unter Oxytocinstimulation im Vergleich von Gruppe A und B signifikante Unterschiede in den einzelnen Substanzgruppen. Die Versuche unter Oxytocinstimulation von Gruppe B wurden für den Vergleich der verschiedenen Substanzen zueinander nicht gewertet. Diese Daten umfassten 91 Versuche an 30 Myometriumstreifen von insgesamt 7 Proben von schwangeren Frauen. Bei Versuchen unter Spontankontraktionen wurde beim Vergleich von Gruppe A zu B kein Unterschied festgestellt. Die Versuche unter spontanen Kontraktionen von Gruppe A und B wurden in einen Datenpool für die weitere Auswertung verwendet.