

4. MATERIAL UND METHODEN

Aufgrund verschiedener Forschungsarbeiten, die sich ebenfalls mit isolierter Organperfusion beschäftigen, können wir bei der Versuchsdurchführung und Organgewinnung grundlegende Techniken dieser Arbeiten anwenden.

4.1 Material

4.1.1 Aufbau der Versuchsapparatur

Die Firma Mediport Biotechnik GmbH (Berlin) entwickelte Anfang 1998 eine Apparatur zur Perfusion isolierter Säugetierorgane, welche uns für dieses Projekt zur Verfügung gestellt wurde. Bei diesem Perfusionsapparat handelt es sich um drei Kreisläufe, die zur optimalen Versorgung von isolierten Organen außerhalb des Körpers verbunden sind.

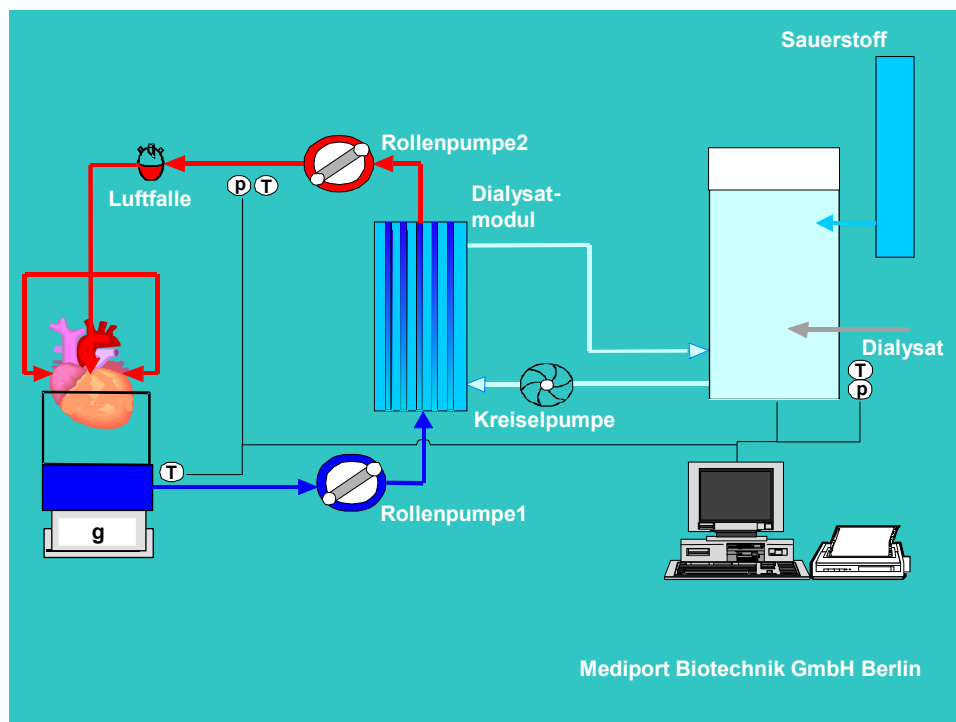


Abb. 10: Perfusionsapparat, schematisch dargestellt

Es handelt sich dabei um einen:

1. Blutkreislauf
2. Dialysatkreislauf
3. Wärmekreislauf

4.1.1.1 Der Blutkreislauf

Bei dem verwendeten Blut handelt es sich um autologes Schweineblut. Für die Versuchsdurchführung wird dieses mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung nach Modersohn et al. (2001) verdünnt. Im folgenden Text wird dieses als „Perfusat“ bezeichnet. Der Blutkreislauf teilt sich in einen arteriellen und einen venösen Schenkel. Im Dialysem modul (High Flux Polysulphon Kapillardialysator der Hemoflow F-Serie, Fa. Fresenius AG, 61343 Bad Homburg) wird das Perfusat oxygeniert, filtriert und erwärmt (von Baeyer et al., 1997). Danach wird es von der Rollerpumpe 1 (Watson Marlow 505U, Fa. Watson-Marlow Limited; Falmouth, Cornwall TR11 4 RU, England) über eine Luftfalle den drei Kathetern, die das Herz versorgen, zugeführt. Die Luftfalle soll eine Luftembolie verhindern. Die drei Katheter sind mit der A. cor. sin., der A. circumflexa und der A. cor. dex. verbunden. Das venöse Perfusat aus dem Herz wird in einem Reservoir aufgefangen und von dort über die Rollerpumpe 2 (wie Rollerpumpe 1) wieder dem Dialysem modul zugeführt. Das Perfusat-reservoir befindet sich auf einer Waage (Sartorius PT6, Sartorius AG, 37075 Göttingen) und registriert das Gewicht. Bei Abweichungen vom vorgegebenen Wert kann das Gewicht über die Steuerungseinheit durch Veränderung der Drehzahl reguliert werden. Die Perfusatkonzentration wird dadurch konstant gehalten. Der Perfusionsfluss des Organs wird durch die Drehzahl der Rollerpumpen bestimmt. Der Perfusionsdruck ergibt sich aus dem Perfusionsfluss und dem Organwiderstand und wird an der Luftfalle im arteriellen Bereich gemessen.

Formel:

OR: Organwiderstand, berechnet mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes

$$R = \Delta P / CBF$$

ΔP : arteriovenöse Druckdifferenz, CBF: Organfluss ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$)

Der arterielle Druck im Perfusionsystem ist der Perfusionsdruck (CPP). Ein venöser Druck ist nicht vorhanden, da der venöse Ablauf frei erfolgt. Damit entspricht \bar{P} dem CPP. Die Einheit von OR ist damit: $\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot 100\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Sowohl die Daten des Perfusionsflusses als auch des Perfusionsdruckes werden über die Steuerungseinheit an einen Computer übermittelt und gespeichert.

4.1.1.2 Der Dialysatkreislauf

Die Dialysatlösung befindet sich in einem geschlossenen Behälter, welcher über Schlauchverbindungen mit dem Dialysemodul und einer Sauerstoffflasche (Mischung 95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) verbunden ist. In diesem Behälter befindet sich ein Heizstab des Wärmekreislaufes, über den die Dialysatlösung auf 37° C erwärmt wird. Das Dialysat wird permanent begast und über eine Kreiselpumpe (Heidolph Typ 523.031.00010B, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, 93309 Kelheim) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 l pro Minute auf die andere Seite der Membran in das Dialysemodul gepumpt. Über einen abführenden Schlauch gelangt es wieder in das Reservoir.

4.1.1.3 Der Wärmekreislauf

Ein Wasserbad wird durch eine Heizspirale mit integrierter Pumpe (Haake C1) auf 40° C erhitzt. Über die Pumpe durchströmt das erwärmte Wasser den Heizstab des Dialysatbehälters und hält somit die Temperatur des Dialysates konstant. Das Dialysat erwärmt das Perfusat im Dialysemodul, sodass das Perfusat nicht unter 37° C abkühlen kann. Da durch die Schlauchsysteme des Perfusionsapparates Wärme verloren geht, liegen die hier gewählten Temperaturen über denen der anderen Kreisläufe. Die Temperaturen werden kontinuierlich durch Thermometer sowohl im Dialysatbehälter als auch im Perfusatresevoir gemessen.

4.1.2 Linksventrikuläre Druckmessung und „Working Heart-Modell“

Das „Working Heart-Modell“ (siehe Abb. 11 und 12) wird am linken Ventrikel mit der Aorta und der V. pulmonalis verbunden. Außerdem wird es an eine „Wassersäule“ angeschlossen. Das Blutvolumen im Ventrikel und der Druck werden von dem Herz selbstständig entwickelt. In den rechten Ventrikel wird ein Ballonkatheter mit 20 ml NaCl gesetzt, sodass es sich hier nicht um eine herzeigene Druck-Volumen-Entwicklung handelt. Am linken Ventrikel und am Ballonkatheter werden über Messmodule die Daten an einen Computer übermittelt. So können sie während des Versuches überwacht und gespeichert werden.

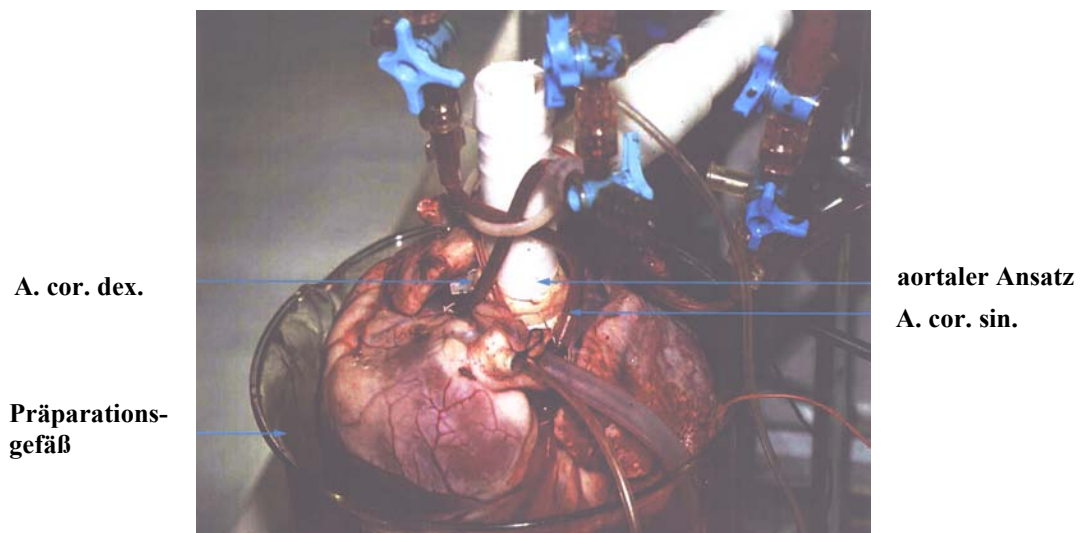
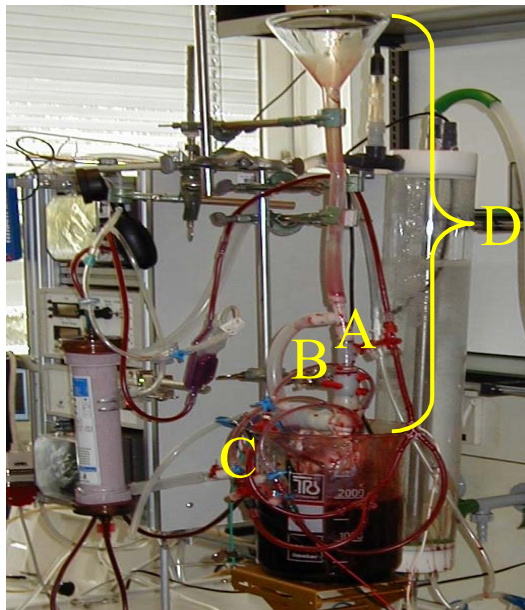


Abb. 11: Schweineherz im Präparationsgefäß mit kanülierten Koronararterien.



- A: aortale Verbindung
- B: Vena pulmonalis
- C: linksventrikuläre Druckmessung
- D: Aorta, Anschluss an die Wassersäule

Abb. 12: Der isolierte „working heart-Kreislauf“, verbunden mit der Aorta (Nachlast, A) und der Vena pulmonalis (Vorlast, B). Linksventrikuläre online Druckmessung (C) aus der Aorta (Nogueira et al., 2000; Habighorst et al., 2001)

4.1.3 Der Defibrillator

Die Schweineherzen werden nach Anschluss an das System mit einem tragbaren Defibrillator reanimiert. Es handelt sich um ein Kombinationsgerät, mit welchem gleichzeitig ein EKG aufgezeichnet und ein Schrittmacher installiert werden kann (Physio Control, Lifepak 9P, Fa. Jochum Medizin Technik). Zur Defibrillation werden aufgrund der Herzgröße Löffelektroden angeschlossen. Das Herz wird mit einem Energiebereich von 10-15 Joule reanimiert. Die restlichen Funktionen dieses Gerätes werden nicht benutzt.

4.1.4 Oximeter- und Blutgasanalysegeräte

Sowohl die regelmäßige Blutgasanalyse arterieller und venöser Perfusatsproben als auch die Gasanalysen des Dialysates werden mit Hilfe eines ABL 555 Analysesystems (Blutgas-, Elektrolyt-, Metaboliten-System, Fa. Radiometer, Kopenhagen, DK) ermittelt.

Für die Oximetrie wird ein OSM 3 (Fa. Radiometer, Kopenhagen, DK) verwendet. Durch eine Kopplung beider Geräte werden folgende Werte bestimmt:

1. pH-Wert
2. Sauerstoffpartialdruck
3. Kohlendioxidpartialdruck
4. Kaliumgehalt
5. Natriumgehalt
6. Calciumgehalt
7. Bicarbonat
8. Gesamt-Hämoglobinkonzentration
9. Gesamt-Sauerstoffgehalt

4.1.5 Proben für bestimmte Parameter des Muskelstoffwechsels: Laktat (Lac), Glucose (Gluc), Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT bzw. neu Aspartataminotransferase AST)

Sowohl Dialysatproben als auch arterielle und venöse Blutproben werden mittels einer Minifuge 2 (Heraeus Christ GmbH, Osterode) zentrifugiert. Die entstandenen Serumproben werden in Eppendorfröhrchen abgefüllt und bei -18°C tiefgefroren.

4.1.6 Verwendete Lösungen

4.1.6.1 Natriumzitratlösung

Das gewonnene autologe Blut wird direkt mit einer 3,2 % Natriumzitratlösung versetzt. Das Zitrat bindet Calcium, wodurch eine Koagulation verhindert werden soll. Die Lösung wird durch die Mitarbeiter der Firma Mediport einen Tag vor der Herzentnahme nach folgendem Rezept (siehe Tab. 2) angesetzt. Es wird eine 0,9 %ige Kochsalzlösung und Aqua ad injektabilia verwendet, um eine physiologische Osmolarität zu erreichen.

Tab. 2: Rezept für Natriumzitratlösung

ml	Zutat	Firma
32	Aq. ad. inj.	50 ml Inj.-Lsg., Fa Delta-Pharma 72793 Pfullingen
10	NaCl-Lsg. 0,9 %	500 ml isotone Kochsalzlsg., Fa. B. Braun, 34209 Melsungen
8	Natriumzitat-Lsg. 20 %	Lösung aus 20 g Natriumzitat X2 H ₂ O , wasserfreie Zitronensäure 25 mg; Virchow-Klinikum Apotheke, 13353 Berlin

4.1.6.2 Kardioplegielösung

Um das Schweineherz während des Transportes zu konservieren, wird eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Diese Kardioplegielösung wird durch die Mitarbeiter der Firma Mediport jeweils am Versuchstag frisch angesetzt, mit Sauerstoff begast und sowohl während der Lagerung als auch während des Transportes auf 4° C kühl gehalten. Die genaue Zusammensetzung ist in Tab. 3 beschrieben. Der Lösung werden Glucose und Insulin hinzugefügt, damit die Energiegewinnung unter ischämischen Bedingungen sichergestellt ist (Grynberg und Demaison, 1996; Buckberg, 1987). Heparin dient der Antikoagulation. 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) wird zugefügt, da sich BDM in experimentellen Studien als Langzeitkonservierungsmittel für Herzen bewährt hat (Boban et al., 1993; Stringham et al., 1992; Stowe et al., 1994). Es wirkt als Chelatbildner für Calcium und erreicht so eine Reduktion freier Calcium-Ionen (Garcia-Dorado et al., 1992).

4.1.6.3 Dialysatlösung

Für den Versuch und zur Verdünnung des autologen Blutes wird die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung -wie oben beschrieben- zubereitet. Es werden Glucose, Insulin und Heparin hinzugefügt.

4.1.6.4 Perfusat

Es handelt sich um das diluierte autologe Blut. Der Dialysatlösung wird zu diesem Zweck noch Albumin (Bovines Serum Albumin, Sigma, München) beigemischt, um den intravasalen onkotischen Druck zu stabilisieren und ausreichend Trägerstoffe für wasserunlösliche Substanzen zu erhalten.

Tab. 3: Rezept der Kardioplegie-, Dialysat- und Perfusatlösung aus zwei Stammlösung nach Modersohn et al. (1997)

Stammlsg. I Krebs-Henseleit-Lsg. (Standard)

Menge	Substanz	Firma
5 l	Aqua dest.	Institut für klin. Pharmakologie und Toxikologie, CBF, Berlin
371,10 g	NaCl (= 1280 mmol)	Natriumchlorid (Sodium chloride, Merck, Darmstadt)
8,58 g	KCl (= 23 mmol)	Kaliumchlorid (Potassium chloride, Merck, Darmstadt)
105,02 g	NaHCO ₃ (= 250 mmol)	Natriumhydrogencarbonat (Sodium hydrogencarbonat, Merck, Darmstadt)
8,85 g	KH ₂ PO ₄ (= 13mmol)	di-Kaliumhydrogenphosphat (di-Potassium hydrogen phosphate, Merck, Darmstadt)

Stammlsg. II Krebs-Henseleit-Lsg. (Standard)

5 l	Aqua dest.	Institut für klin. Pharmakologie und Toxikologie, CBF, Berlin
27,38 g	CaCl ₂ (= 25 mmol)	Calciumchlorid (Calcium chloride dihydrat, Merck, Darmstadt)
7,39 g	MgSO ₄ (= 6 mmol)	Magnesiumsulfat (Magnesiumsulfate heptahydrate, Merck, Darmstadt)

Ansatz der modifizierten Lösung

3 l	Aqua dest.	
500 ml	Stammlösung I	
500 ml	Stammlösung II	
1 l	Aqua dest.	
10 g	Glucose	D(+)-Glucose Merck, Darmstadt
1,25 ml	Insulin	Insulin Actrapid HM, 40 I.E./ml (ge) Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz
2 ml	Heparin	Heparin (5000 U/ml) Biochrom AG, Berlin

Zusatz zur Kardioplegielösung

30 mmol/l	BDM	2,3-Butanedione Monoxime, Sigma, St. Louis, USA
-----------	-----	--

Zusatz zum Perfusat

50 g	Albumin	Sigma, St. Louis, USA
------	---------	-----------------------

4.1.6.5 Methacarn-Lösung

Nach Versuchsabschluss wird mittels eines Einmalskalpells (Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) Myokardgewebe von den Herzkammern und den Vorhöfen entnommen. Zur Konservierung und Fixierung der Gewebeproben wird eine Methacarn-Lösung frisch angesetzt (Shibutani et al., 2000; Uneyama et al. 2002).

Die Lösung enthält:

60 % absolut Methanol

30 % Chloroform

10 % Essigsäure

Die Proben werden 24 Stunden in dieser Lösung fixiert.

4.1.7 Medikamente der Versuchsgruppen

4.1.7.1 Quinaprilat (Accupro[®])

Bei Quinapril handelt es sich um einen ACE-Hemmer. Er ist ein so genanntes Prodrug. Nach Eintritt in den Blutkreislauf wirkt der eigentliche Metabolit Quinaprilat.

Das ACE wird durch die hohe Bindungsaffinität von Quinaprilat kompetitiv gehemmt, sodass folglich die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II durch das ACE nicht mehr stattfinden kann.

4.1.7.2 Angiotensin I

Die Wirkung von Angiotensin I (Sigma, München) ist im Kapitel 3.6. beschrieben. Durch Zugabe kann das RAS während der Versuche auch bei geringen Konzentrationen von Renin aktiviert werden.

4.1.7.3 Messung von Angiotensin im kardialen Gewebe

Die Messung des Angiotensin I- und II-Levels im Myokardgewebe wird im Labor von Herrn Prof. Dr. A. H. Danser (Erasmus-Universität, Rotterdam, Niederlande) durchgeführt. Die Konzentration wird aus gepoolten Proben einer gesamten Gruppe bestimmt. Nach einer SepPak-Extraktion und Auftrennung durch eine Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) erfolgt die Untersuchung mittels Radioimmunassay (Danser et al., 1994, van Kats et al., 1997).

4.1.8 Elektronenmikroskopie

4.1.8.1 Fixierung und Lagerung

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung müssen die Präparate eine Dicke von unter 1 μm haben. Sie müssen wasserfrei sein und speziell präpariert werden, um morphologische Veränderungen an den Kardiomyozyten zu erkennen. Zuerst werden die Gewebeproben in einer Karnowski-Lösung mindestens 12 Stunden bei 4° C fixiert.

Diese Lösung besteht aus:

15 %	25 % Glutaraldehyd
45 %	0,2 M Phosphatpuffer
40 %	Paraformaldehyd (Sigma, München)

Es erfolgt eine 2-malige Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung (Berlin-Chemie, Berlin). Nun gibt man die Proben in ein mit 1,5 ml Osmiumtetroxid (Plano, Wetzlar) beschichtetes Gefäß. Hier verbleiben sie bei 4° C für eine Stunde. Danach erfolgt eine weitere Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung und die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 % für je 10 min). Auf diese Weise können sie bei 18° C gelagert werden.

4.1.8.2 Standard-Epon-Einbettung

Bei diesem Verfahren werden die Proben durch eine höhere Alkoholreihe (80 %, 90 %, 96 %, und 2x 100 % für je 10 min) entwässert. Es erfolgt eine Spülung mit Styrol (Merck, Darmstadt) für 30-60 min. Danach werden die Proben für 12 Stunden in eine Lösung gegeben, in der sie durch Verflüchtigung der Substanzen leicht aushärten. Diese Lösung besteht aus Styrol, Glycidether, Dimethylaminomethylphenol (DMP, SERVA, Heidelberg), Methyladenicanhydrid (MNA, SERVA Heidelberg) und Dodeceny succinatsäureanhydrid (DDSA, SERVA, Heidelberg). Am nächsten Tag werden sie in eine Lösung aus Glycidether, MNA, DMP und DDSA eingelegt. Bei diesem Prozess bleibt das Gefäß verschlossen, um die oben beschriebene Verflüchtigung zu verhindern. Am Tag darauf können die Proben in eine Form gegossen und im Brutschrank bei 60° C 10 min lang gehärtet werden. Danach können Schnitte angefertigt werden. Die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop (EM 10 C/CR) findet bei 5000- und 10 000-facher Vergrößerung statt.

4.1.9 Histologie

4.1.9.1 Paraffineinbettung der Organproben

Die Proben werden für 24 Stunden in Methacarn-Lösung fixiert und für weitere 24 Stunden in 80 %igem Ethanol aufbewahrt. Anschließend werden sie in Histologie-Kassetten umgelagert. Die Entwässerung und Paraffineinbettung erfolgt in einem Histokinetteautomaten (Fa. British American Optical, Bucks, England) nach dem Tauchprinzip. Die Gewebeproben werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 % Ethanol für 2 Std.; 100 % Ethanol für 4 Std., J. T. Baker, England; und 2 Stunden in Isopropylalkohol) entwässert. Daraufhin wird 6 Stunden im Intermedium und 3 Stunden in einem Wärmepf mit einem Gemisch aus Intermedium und Paraffin im Verhältnis 1:1 der Alkohol entfernt. Im letzten Schritt der Einbettung kommen die Kassetten für 24 Stunden in einen Wärmepf mit reinem Paraffin.

4.1.9.2 Schneiden und Färben der Herzproben

Um die Gewebeproben schneiden zu können, müssen sie in dafür geeignete Einbettungsringe mit reinem Paraffin umgelagert werden. Dies erfolgt mit einer Einbettvorrichtung. Es werden jeweils 8 Schnitte mit einer Schnittdicke von 3 μm mit einem Rotationsmikrotom der Firma Microm angefertigt und auf einen Objektträger für die Sirius-Rot-Färbung übertragen. Nachdem der Objektträger auf einer mit 37° C eingestellten Wärmeplatte getrocknet ist, erfolgt die Sirius-Rot-Färbung in einem Färbeautomat der Firma Microm. Die Färbeschritte werden wie folgt durchgeführt.

4.1.9.3 Sirius-Rot-Färbung - Rezept:

1. Histo-clear für 30 min,
2. absteigende Alkoholreihe: 100 %iger Alkohol für 5 min
90 %iger Alkohol für 5 min
80 %iger Alkohol für 5 min
70 %iger Alkohol für 5 min
3. Spülung in H₂O für 3 min und Aqua dest. für 2 min
4. Sirius-Rot F3BA für 60 min
5. 0,01 N HCL für 4 min
6. aufsteigende Alkoholreihe: 70 %iger Alkohol für 3 min
90 %iger Alkohol für 3 min
95 %iger Alkohol für 5 min
95 %iger Alkohol für 5 min
100 %iger Alkohol für 5 min
7. Histo-clear für 30 min

4.1.9.4 Quantitative Bildanalyse der interstitiellen und perivaskulären Fibrose im Myokard

Die computergestützte Auswertung der Fibroseareale erfolgt mit einem Bildausschnitt der mit Sirius-Rot gefärbten Präparate. Die Sirius-Rot-Färbung ist spezifisch für Gesamtkollagen und

detektiert damit das Ausmaß der interstitiellen und perivaskulären Fibrose im Herz. Für die Quantifizierung werden vom Präparat im Durchlicht 5-6 unterschiedlichen Bildausschnitten mit einer metrischen Flächengröße von $20848,32 \mu\text{m}^2$ aufgenommen (Abb. 13).

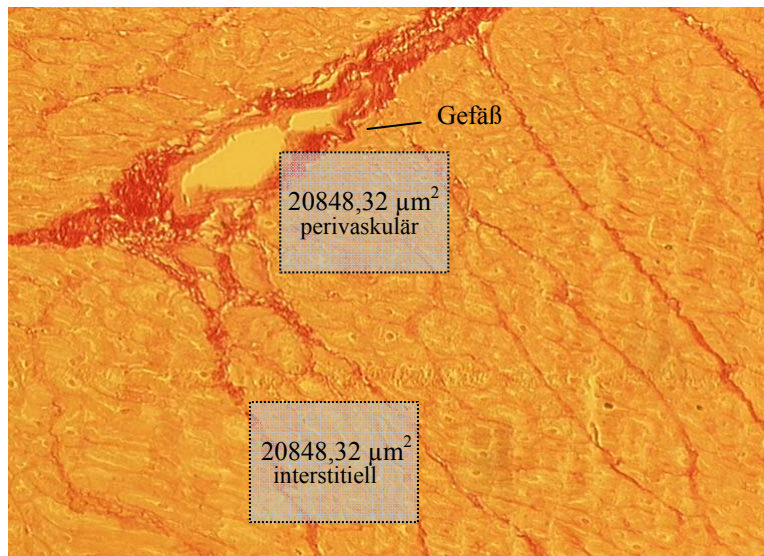


Abb. 13: Prinzip der computergestützten Auswertung der Sirius-Rot-Färbung im Herz.

Für die Aufnahme der Bilder wird das Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) verwendet, welches mit einem Videosystem der Firma AVT-HORN verbunden ist. Dieses Videosystem beinhaltet eine Farb-Videokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, ein externes Kamerasteuergerät und einen Frame Grabber. Um von dem Herzmuskelgewebe digitale Bilder zu erhalten, wird die Farb-Videokamera mit dem externen Kamerasteuergerät an einen Computer, Power Macintosh 8200/120, und den Frame Grabber angeschlossen. Alle Bilder werden nach einer Aufwärmzeit der Bildanalyseeinheit von 10 Minuten mit den gleichen Einstellungen am Mikroskop und der Kamera digitalisiert und im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert. Es wird eine Sicherungskopie auf einer beschreibbaren CD vorgenommen und mit dem Freeware-Programm Scion Image 1.62a ausgewertet. Für die Messung der gefärbten Flächen wird die Bildanalyseeinheit zunächst mit einem Objektmikrometer auf metrische Einheiten kalibriert. Die Software wandelt das Bild auf der Grundlage von Grauwerten in schwarze und weiße Bereiche um. Die schwarzen Areale entsprechen dem mit Sirius-Rot gefärbten Gesamtkollagen, der weiße Hintergrund dem nicht mit Sirius-Rot gefärbten Gewebe. Der Schwellenwert für die Detektierung der fibrotischen Areale wird automatisch gesetzt und nach Vergleich mit dem Farbbild gegebenenfalls neu eingestellt. Die schwarzen Areale werden gemessen und als prozentualer Anteil vom Gesamtbild angegeben.

Die Auswertung der Bilddaten kann durch die im Bildanalyseprogramm integrierte Makrosprache Pascal weitgehend automatisiert werden, wobei das Prinzip dieser Bildanalyse als halbautomatisiertes Verfahren einzustufen ist. Von allen ausgemessenen Bildausschnitten wird der Mittelwert gebildet.

4.1.9.5 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Endpunktfärbung, d.h. je länger man färbt, desto mehr Farbstoff bindet sich. Sie ist regressiv, was bedeutet, dass man den Schnitt überfärbt und überschüssige Farbe mit Wasser entfernt wird. Durch den Kernfarbstoff Mayers Hämalaun und den Plasmafarbstoff Eosin können die Zellstrukturen dargestellt werden. Positiv geladenes Hämalaun färbt in saurem Milieu nur die negativ geladenen Nukleinsäuren (DNA/RNA) blau an. Bei Eosin handelt es sich um einen sauren Plasmafarbstoff. Mittels dieser Färbung lässt sich Zytoplasma blassrot, kollagenes Bindegewebe rot, elastisches Bindegewebe rosa und Muskelgewebe dunkelrot darstellen, wie in Abb. 14 dargestellt. Für die Aufnahme der Bilder wird -wie oben beschrieben- das Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss (Oberkochen), verwendet.

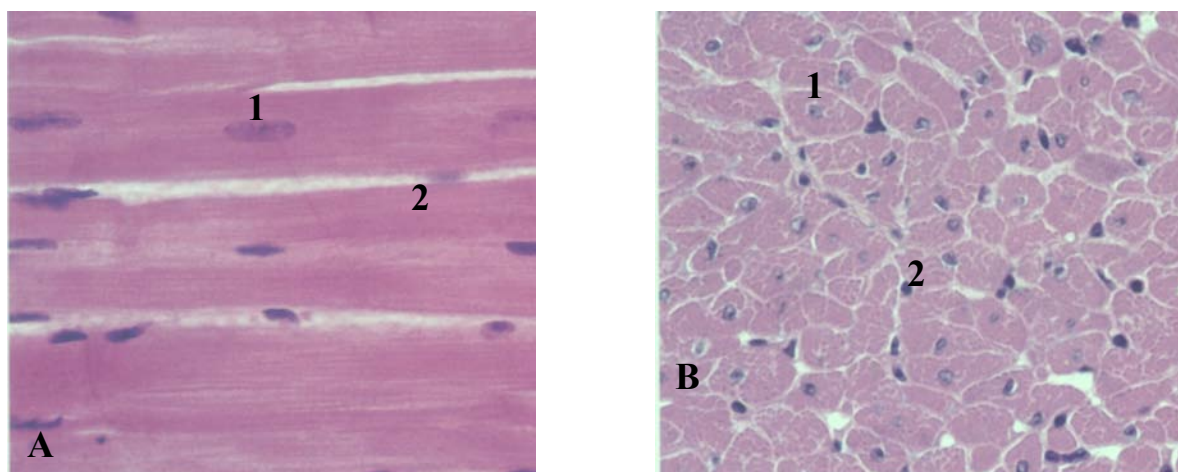


Abb. 14: A: Längsschnitt durch Herzmuskelgewebe, B: Querschnitt durch Herzmuskelgewebe; 1, 2 = Hämalaun-gefärbte Zellkerne; Färbung Hämatoxylin-Eosin, Vergr. 480-fach (Liebich, Funktionelle Histologie der Haussäugetiere 2004)

4.1.10 Protein-Extraktion und Western Blot

Um die Proteine zu extrahieren, werden 100 mg gefrorenes Herzgewebe in 1 ml eisgekühltem Lysis-Puffer 30 min lang mit dem Polytron homogenisiert. Die Homogenate werden in der Kühlzentrifuge 30 min lang bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände werden in Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80° C gelagert. Die Proteinkonzentration wird mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Fa. Pierce, Irland) kalorimetrisch bestimmt:

1. je 10 µl Proteinextrakt zu 20 µl des Reagenzes A und 20 µl des Reagenzes B (1:50)
2. 10 µl des BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma, München) Standards mit dem Reagenz
A+B vermischen
3. Proben und Standards gut schütteln
4. 30 min lang bei 60° C inkubieren

Nach der Inkubation wird die Reaktion auf RT gebracht und somit gestoppt. Die Messung der Farbstoffintensitäten erfolgt im Spectrofotometer bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Gesamtproteinkonzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Pro-Konz. [mg/ml]} = \frac{2 * \text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}}$$

Zur Auftrennung der Proteine werden 10 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-PAGE benutzt. Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit 80 % Ethanol wird das Trenngel gegossen. Um eine ebene Oberfläche zu erhalten, wird dieses mit Isopropanol überschichtet. Es folgt eine Polymerisation für 30 min. Danach wird das Isopropanol gründlich vom Trenngel entfernt. Nun wird das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in welchem der Kamm platziert wird. Nach Abschluss der Polymerisation wird der Kamm entfernt. Die nächsten Schritte verlaufen wie folgt:

1. Denaturierung von 200 µl Proteinextrakt mit 50 µl Probenpuffer und 15,6 µl 5 % 2-Mercaptoethanol für 10 min bei 95 °C
3. Füllung der oberen und unteren Pufferkammer mit 1 x Laufpuffer und gründliche Spülung der Geltaschen
4. Proben auftragen

5. in Kammern pro Probe je 20 μ l pipettieren
6. Auftrennung der Proben erfolgt erst 15 min lang bei 80 Volt, danach 60 min lang bei 120 Volt.

Ist die Auftrennung der Proben erfolgt, werden die Glasplatten entfernt und das Gel auf ein Filterpapier und die Nitrozellulosemembran in eine mit Transfer-Puffer beschichtete Blot-Kammer (Biometra, Göttingen) gelegt. Um die Kammer blasenfrei zu schließen, wird ein Filterpapier auf das Gel gelegt. Das Blotten erfolgt 2 mal 30 min lang bei 120 Volt. Über Nacht inkubiert man die Membranen in Blocking Puffer bei 4° C. Der Verdünnungsgrad des Primär-Antikörpers mit dem Blocking-Reagenz entspricht dem Verhältnis von 1:1000. Er wird 1 h lang bei RT mit der Membran inkubiert. Die Membranen werden dann 5-mal mit Blocking Puffer gewaschen. Die Verdünnung des Sekundär-Antikörpers mit dem Blocking-Reagenz erfolgt im Verhältnis 1:5000. Dieser wird 30 min lang bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Danach werden die Membranen 5-mal mit Blocking Puffer und drei Mal mit 0,1 M Tris-Puffer mit 0,05 M $MgCl_2$ und 0,1 M NaCl gewaschen. Die Detektion spezifischer Bindungen erfolgt mittels der Entwickler Nitroblautetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat (BCIP). Die Membranen werden 160 min in eine Färbekammer mit Entwickler-Lösung gelegt. Anschließend erfolgt die Spülung der Membranen mit destilliertem Wasser (2-mal 10 min). Nach der Trocknung werden sie in Saran-Film luftblasenfrei eingepackt. Es wird ein Foto mit einer Kamera angefertigt. Zur Bestimmung der Densitometrie (Aida Image Analyse 2.11-Programm, Raytest Isotopenmeßgeräte) wird dieses eingescannt. Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung wird bei gleich Das großen Messfeldern als Integral zum Hintergrund in Prozent angegeben (Integral-Bkg [%]).

4.2 Das hämoperfundierte arbeitende Schweineherz

Die von uns verwendeten Schweineherzen werden durch die Mitarbeiter der Firma Mediport Biotechnik auf dem Schlachthof in Ruhlsdorf (Berlin) gewonnen. Im Labor der Firma Mediport werden die Herzen an uns übergeben. Präparation und Perfusion fand danach im Labor der Arbeitsgruppe Grimm (Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Garystr. 5, 14195 Berlin) statt.

4.2.1 Industrielle Schlachtung

Bei Ankunft der Tiere auf dem Schlachthof erfolgt eine Schlacht tieruntersuchung nach Anlage 1 Kap. I Nr. 1-4 der Fleischhygiene-Verordnung durch den zuständigen Tierarzt. Dabei werden die Schweine auf einen guten Allgemeinzustand, offensichtlich ansteckende Krankheiten sowie Verletzungen oder Transportschäden untersucht. Nach diesen Kriterien werden auch die Tiere für die Versuchsorgan-Gewinnung ausgewählt. Die ausgewählten Tiere waren 5-8 Monate alt und hatten ein Lebendgewicht von ca. 75-100 kg. Zur Schlachtung werden die Tiere durch einen Elektroschock am Ohrgrund (250 Volt für 10 sec) betäubt, an den Hinterextremitäten aufgehängt und über einen Stich in die Vena cava cranialis entblutet. Danach erfolgt die Reinigung und Entborstung der Schlachtkörper durch einen Brühvorgang bei 58°-65° C (Fries, 1992). Anschließend beginnen das vorschriftsmäßige Ausweiden und die Zerlegung. Das Herz wird bei diesem Schlachthergang ca. 10 bis 15 min nach der Tötung als Teil des Geschlinges gewonnen.

4.2.2 Schlachthergang zur Gewinnung der Versuchsherzen (Ast, 2000)

Der gesamte Arbeitsgang wurde von der Firma Mediport durchgeführt.

Um Herzen für unsere Versuchszwecke zu gewinnen, wird der Schlachtablauf modifiziert. Ziel war es, die Organe nach dem Entbluten direkt zu gewinnen. Mit der Kardioplegielösung soll ein unmittelbarer Herzstillstand erreicht werden und die Schädigung durch Sauerstoff- oder Substratmangel verhindert werden (Buckberg, 1987). Es wird sich an den Grundsätzen der Herzkonservierung bei herzchirurgischen Eingriffen und Transplantationen orientiert. Somit muss das Brühen ausgeschlossen werden. Um die unmittelbare Entborstung nach der Schlachtung zu umgehen, sieht die Fleischhygieneverordnung eine Enthäutung der Tiere vor (FIHV, Anl. 2, Kap. III, 2.2). Diese Auflage kann durch den Schlachthof erfüllt werden, da diese Tätigkeit innerhalb der Schlachtgesellen-Ausbildung vorgesehen ist. Damit können die Tiere weiterhin uneingeschränkt der Lebensmittelherstellung zugeführt werden.

4.2.3 Gewinnung des autologen Blutes

Mit dem Entbluten der Schweine beginnt die Phase der warmen Ischämiezeit (Beginn von Substrat- und Sauerstoffmangel). Um das Blut aufzufangen und eine mechanische Schädigung so gering wie möglich zu halten, wird ein sterilisiertes metallenes Auffanggefäß mit ca. 5 l Fassungsvermögen nah an die Einstichstelle gehalten. Direkter Hautkontakt wird dabei vermieden. Das Gefäß wird vorher mit 50 ml 3,2 % Natriumzitrat-Lösung ausgeschwenkt, damit keine Blutgerinnung einsetzt. Während dieser Auffangphase wird das Blut durch eine zweite Person konstant mit einem Glasstab verrührt, um eine homogene Mischung mit der Natriumzitrat-Lösung zu erreichen. Danach werden für uns 2 Kunststoffflaschen à 1 Liter, in denen sich 10000 I.E. Heparin befinden, durch einen heparinisierten Glastrichter (5000 I.E. Heparin; Liquemin 5000 Ampullen, Hoffmann-La Roche AG, 79630 Grenzach Whylen) abgefüllt. Die verschlossenen Flaschen werden daraufhin für 1 Minute langsam auf dem Boden gerollt, um eine gute Vermischung zu erreichen.

4.2.4 Gewinnung des Organs

Für die bedeutenden Zeitpunkte während der Herzentnahme wird ein so genanntes Schlachthofprotokoll erstellt. Es werden sowohl Daten wie Geschlecht, Alter, Gewicht zum Tier als auch wichtige Zeitangaben protokolliert (siehe Tab. 4). Es wird ein paramedianer Thoraxschnitt im knorpeligen Bereich der Rippen angelegt und der Thorax mittels eines Thoraxspreizers eröffnet. Über diesen Zugang wird der Herzbeutel eröffnet. Zur Entnahme des Herzens wird es in die Hand genommen und Aorta, Venae cavae, Truncus pulmonalis und Venae pulmonales an der Herzbasis durchtrennt. Danach erfolgt die Aufbewahrung in einem Kunststoffbeutel mit einer 4° C kalten Kardioplegielösung. Von außen wird dieser zusätzlich mit Eis gekühlt. Zu diesem Zeitpunkt endet die warme Ischämiezeit und die kalte Ischämiezeit beginnt. Im Kunststoffbeutel erfolgt die koronare Perfusion mit der Kardioplegielösung, um schnellstens einen Herzstillstand zu erreichen. Nach der vollständigen Spülung wird das Herz auf die Qualität beurteilt.

Folgende Kriterien werden untersucht:

1. weiche Konsistenz, als Zeichen einer Konservierung in der Diastole
2. Verletzungen des Kammermyokards
3. eine glattes, durchscheinendes Epikard ohne Auflagerungen oder Verwachsungen
4. klar gezeichnete Gefäße ohne koagulierte Blutreste

Eine erneute Beurteilung erfolgt durch uns bei der Übergabe des Herzens und vor der Präparation für den Versuch. Kommt es während dieser Zeit zu einer deutlichen Verhärtung der Kammermuskulatur oder zu sichtbaren oberflächlichen Veränderungen, so finden die Herzen keine Verwendung für unsere Versuchszwecke. Durch frühere Untersuchungen (Henze et al., 1989) ist bekannt, dass schon eine geringe Herzmuskelverhärtung eine Revitalisierung des Herzens fast unmöglich macht. Außerdem kann nur ein deutlich geringerer Perforationsfluss erreicht werden. Während des Transportes in das Labor befindet sich das Herz in einem wasserdicht verschlossenen, mit Kardioplegielösung gefüllten Kunststoffbeutel und wird auf 4° C kühl gehalten.

Tab. 4: Schlachthofprotokoll

Datum	
Ort	Ruhlsdorf
Geschlecht	weiblich
Rasse	Deutsche Landrasse
Gewicht	ca. 80 kg
Alter	5-7 Monate
	Uhrzeit
Beginn Betäubung	08:32:03
Ende Betäubung	08:32:16
Entblutungsanfang	08:32:54
Entblutungsende	08:33:17
Thoraxschnitt	08:33:43
Beginn Herzabnahme	08:34:20
Herz in Tüte mit Kardioplegielsg.	08:34:56
Beginn Spülung	08:35:17
Ende Spülung	08:40:45
Herz auf Eis	08:43:01
Menge in ml Kardioplegielsg.	9 x 60 ml

4.2.5 Versuchsvorbereitung

Nach der Entnahme des Herzens dauert es ca. 2 Stunden, bis das Herz im Labor ist. Es müssen für die Präparation und die Perfusion des Herzens alle labortechnischen Maßnahmen soweit wie möglich vorbereitet sein, um die gesamte Ischämiezeit so gering wie möglich zu halten. Vor Ort wird das Herz -wie oben beschrieben- noch einmal untersucht und für die Perfusion präpariert. Gleichzeitig werden die Kreisläufe des Versuchsapparates mit ihren Lösungen gefüllt. So kann die Vorlaufzeit genutzt werden, um optimale Temperaturen und Blutwerte für den Perfusionsbeginn des Herzens zu schaffen.

4.2.6 Organpräparation

Das Herz verbleibt während der Präparation immer noch in der Kardioplegielösung in dem Kunststoffbeutel und wird weiterhin in einer Schüssel auf Eis gelagert. So wird ein frühzeitiger Temperaturanstieg des Organs vermieden. Zu Beginn der Präparation wird überschüssiges Binde- und Fettgewebe entfernt, um einerseits die Koronararterien für die Kanülierung freizulegen und andererseits ein exaktes Herzgewicht zu erhalten. Es wird mittels elektronischer Waage vor und nach dem Versuch bestimmt und protokolliert. Nun erfolgt zuerst die Befestigung der „working heart“ Konstruktion in der Aorta mittels eines Kabelbinders. Der seitlich abgehende Silikonschlauch mit ca. 1 cm Durchmesser wird mit einem Kabelbinder am Truncus pulmonalis befestigt und ist so mit dem linken Vorhof verbunden. Der zweite schmalere Schlauch wird durch eine Klemme verschlossen. Später erfolgt der Anschluss über das Modul an den Computer zur linksventrikulären Druckmessung. So entsteht hier ein geschlossenes System. Nun werden die A. cor. sin. und ihr R. circumflexus sowie die A. cor. dex. kanüliert. Dazu werden erst alle drei Koronararterienstämme stumpf von außen freipräpariert und unterführt. So kann dort zur späteren Befestigung chirurgisches Nahtmaterial angebracht werden. Die Gefäßöffnung für die Katheter wird mit größter Vorsicht mittels einer kleinen spitzen Schere in die Koronararterienstämme geschnitten. Der Einschnitt erfolgt maximal 0,5 cm bis 1 cm entfernt von der Aorta. Die Katheter sind selbst konstruiert und bestehen aus gut elastischem Teflonschlauch, der vorne angespitzt ist. Am Ende wird ein Drei-Wege-Hahn angebracht. So können sie während des Einsatzvorganges permanent mit Kardioplegielösung gespült werden, sodass keine Luft in die Koronararterien bzw. weiter ins Gewebe dringen kann. Nach dem Platzieren werden die Katheter mit dem Nahtmaterial an dem jeweiligen Arterienstamm befestigt. Um ein Verdrehen oder Herausrutschen der Katheter während der Anschlussphase zu verhindern, erfolgt eine zusätzliche Befestigung an der „Working Heart“ Konstruktion. Danach erfolgt der Einsatz eines Ballonkatheters über die Vena cava durch den rechten Vorhof in den rechten Ventrikel. Auch dieser ist selbst konstruiert und besteht aus einem dünnen Plastikschlauch mit übergestülptem „Finger“, der von einem Latex-Einmalhandschuh getrennt wird. Am Ende des Plastikschlauches befindet sich ein Drei-Wege-Hahn, sodass der „Ballon“ später mit 20 ml 0,9 % NaCl-Lösung gefüllt und an ein weiteres Modul angeschlossen werden kann. So werden die Daten des rechten Ventrikels an den Computer übermittelt.

4.2.7 Der Anschluss

Mit Abschluss der Organpräparation wird noch einmal das Perfusionssystem überprüft. Es werden Labor- und Blutgasanalysen von Perfusat und Dialysat durchgeführt. Dann wird das Herz auf die Perfusion vorbereitet. Durch mehrmalige Spülung der Katheter mit angewärmter Dialysatlösung wird die Kardioplegielösung weitestgehend aus dem Herz eliminiert. Hierbei ist zu beachten, dass keine Luft über die Katheter in das Gewebe dringt. Das Herz wird als erstes am Stativsystem des Versuchsaufbaus befestigt. Zunächst werden die Pumpen abgestellt und das Schlauchsystem geschlossen. Sind die Katheter angeschlossen, werden die Pumpen wieder angestellt und das Schlauchsystem geöffnet. Dabei muss beachtet werden, dass die Luftfalle aufgrund der Emboliegefahr nicht leer läuft. Um dies zu vermeiden, wird der Perfusionsfluss entsprechend hochreguliert auf 60-120 ml/min/100 g Organgewicht (Referenzwerte nach Scheunert und Trautmann, 1987), bis ein Perfusionsdruck von ca. 80 mmHg bis 120 mmHg (Referenzwerte nach Scheunert und Trautmann, 1987) erzielt wird. Das Herz wird am Stativ so tief wie möglich in das Perfusatresevoir gehängt, um eine konstante „Körpertemperatur“ von 38° C zu erreichen. Die Messmodule für die Ventrikel werden erst bei regelmäßiger Herzaktion nach der Reanimationsphase angeschlossen.

4.2.7.1 Die Reanimation des Herzens

Dabei wird mittels Herzmassage, Noradrenalin und Defibrillator versucht, eine regelmäßige Herzaktion zu erzielen; prinzipiell verfährt man wie beim Menschen, nur handelt es sich um eine geringere Strom- und Medikamentendosis, da alle Maßnahmen direkt am Organ vorgenommen werden. Während das Herz angeschlossen wird und sich durch das umgebende Blutreservoir langsam erwärmt, kann oft schon eine zunächst arrhythmische Herzaktion beobachtet werden. Diese beruht oft nur auf Vorhofkontraktionen und/oder Kammerflimmern. Um einen konstanten Sinusrhythmus zu erreichen, wird das Herz nach Beginn der Perfusion mit 20 bis 30 Joule defibrilliert. Dies erfolgt in Abständen von ca. 10 bis 30 sec, bis sich eine vollständige und regelmäßige Kontraktion des Herzens eingestellt hat. Aufgrund vorangegangener Studien (Lindner und Ahnefeld, 1998; Lindner et al., 1991; Ensinger et al., 1993) wird Noradrenalin (NA) und nicht Adrenalin zur Unterstützung der Reanimation verwendet. Es hat kaum Einfluss auf die Herzfrequenz und bewirkt gegenüber Adrenalin und Dopamin die geringste Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. Nach einem Defibrillations-

versuch wird NA über einen Drei-Wege-Hahn in das Katheter-System injiziert. Die Konzentration bei intrakardialer Verabreichung bei Tieren liegt im μg -Bereich (Löscher et al., 1999). Die Dosis ist abhängig von der Reaktion des Herzens. Bei einmaliger Gabe werden 20 μg injiziert, bei mehrmaligen Injektionen bis zu 60 μg . Die Gabe erfolgt dann im Abstand von mindestens 3 min. Ist die Reanimationsphase erfolgreich beendet, werden alle Parameter von Labor und Hämodynamik kontrolliert und eventuell korrigiert. Die Werte werden dann als sogenannte Basiswerte zu Protokoll gegeben. Auch die computergestützten Aufzeichnungen werden zusätzlich handschriftlich festgehalten.

4.2.7.2 Die Adaptation

In dieser durchschnittlich einstündigen Phase kann sich das Herz an das System anpassen. Alle Laborparameter sowie die Parameter der Hämodynamik können noch individuell eingestellt werden. Die drei wichtigsten Ziele in dieser Phase sind:

1. der autonome Druckaufbau im linken Ventrikel, „Working Heart“
2. Entwicklung eines physiologischen Organflusses (60–120 ml/min/100 g)
3. Erhalt physiologischer Perfusionsdruckverhältnisse (80–120 mmHg)

Werden die oben genannten Bedingungen in dieser Phase nicht erfüllt, wird der Versuch abgebrochen. Oft zeigen diese Organe innere Herzmuskel- oder -klappenveränderungen, die palpatorisch von außen nicht feststellbar sind. Es müssen daher Herzen mit linksventrikulärer Hypertrophie, Mitralklappenstenosen sowie Papillarmuskelverletzungen aussortiert werden.

4.2.8 Datenerfassung

Die Erfassung der hämodynamischen Messwerte, d.h. der Perfusionsfluss (CPF), Perfusionsdruck (CPP), linksventrikuläre systolische Druck (LVP), linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP), rechtsventrikuläre systolische Druck (RVP), rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (RVEDP) sowie die Bestimmung der Herzfrequenz (HF) erfolgt im Abstand von 10 min. Für die Blutgasanalyse und Oximetrie werden alle 30 min. arterielle Blutproben und Dialysatproben aus dem Perfusionssystem entnommen. Die venösen Blut-

proben werden direkt am Organ gewonnen. Die Proben werden unmittelbar nach Entnahme aus dem System mittels des ABL 505 bzw. OSM 3 analysiert. Bei jeder Probe werden ca. 1,5 ml entnommen. Nach der Analyse werden die Proben für die Laborparameter AST, Lac und Gluc vorbereitet. Dabei wird 1 ml Dialysat direkt in ein Eppendorfröhrchen abgefüllt. Die Blutproben werden zentrifugiert und danach 0,1 ml Serum mit 0,9 ml Dialysat verdünnt und in Röhrchen (Eppendorf Cup) abgefüllt und tiefgefroren. Die zeitlichen Abstände der Probenentnahme sind bei allen Versuchen und während allen Versuchsphasen gleich.

4.2.9 Die Versuchsphase der 5 Gruppen

Es werden insgesamt 35 Herzen perfundiert. In der Versuchsphase findet keine Korrektur von Parametern statt. Die gesamte Perfusionszeit beläuft sich bei allen Organen auf mindestens 7 Stunden.

4.2.9.1 Die Gruppe der arbeitenden perfundierten Herzen ohne Intervention (WH)

In dieser Gruppe werden 12 Herzen perfundiert. Die Versuchsphase beschränkt sich darauf, dass das Herz mindestens sechs Stunden selbstständig „arbeitet“ und einen annähernd physiologischen Blutdruck aufbaut.

4.2.9.2 Die Gruppe der MI

In dieser Gruppe werden 10 Herzen perfundiert. Nach der Adaptationsphase wird die Okklusion durchgeführt. Das bedeutet, dass bei den Organen der Katheter, welcher den Ramus circumflexus versorgt, für zwei Stunden geschlossen wird (Ischämiezeit). Während dieser Okklusionsphase wird der Perfusionsfluss so eingestellt, dass der Perfusionsdruck konstant bleibt und dem Druck vor der Okklusion entspricht. Anschließend erfolgt die Re-perfusionsphase mit einem Zeitraum von vier Stunden.

4.2.9.3 Die Gruppe der Ang I–MI

In dieser Gruppe werden 5 Herzen perfundiert. Nach der Adaptationsphase wird die Okklusion durchgeführt. 10 Minuten vor Beginn der Reperfusion wird das Herz mit Angiotensin I behandelt. Es wird eine in der Literatur beschriebene Dosis von 10^{-7} M in 100 μ l ddH₂O (Farquharson et al., 2002; Traquandi und Riva, 1997) verwendet.

4.2.9.4 Die Gruppe der Q-MI

In dieser Gruppe werden 5 Herzen perfundiert und infarziert. Es erfolgt eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer Quinaprilat. Die Dosis wird anhand der Literatur ausgewählt und angewandt. Es werden 5 ml Quinaprilat mit 25 ml NaCL verdünnt (Mitrovic et al., 1996; Lazar et al., 2001). Die Behandlung beginnt auch hier 10 min vor der Reperfusion und erstreckt sich über einen Zeitraum von 30 min, in dem das Quinaprilat sehr langsam appliziert wird, um einen zu starken Abfall des Perfusionsdruckes zu verhindern.

4.2.9.5 Die Gruppe der Q-Ang I-MI

In dieser Gruppe werden nur 3 Herzen perfundiert. Die Herzen werden mit 10^{-7} M in 100 μ l ddH₂O Angiotensin 10 min vor Reperfusion behandelt. 5 min später (d.h. 5 min vor Reperfusion) erfolgt die Behandlung mit Quinaprilat (5 ml Quinaprilat in 25 ml NaCL) über einen Zeitraum von 30 min.

4.3 Versuchsablauf

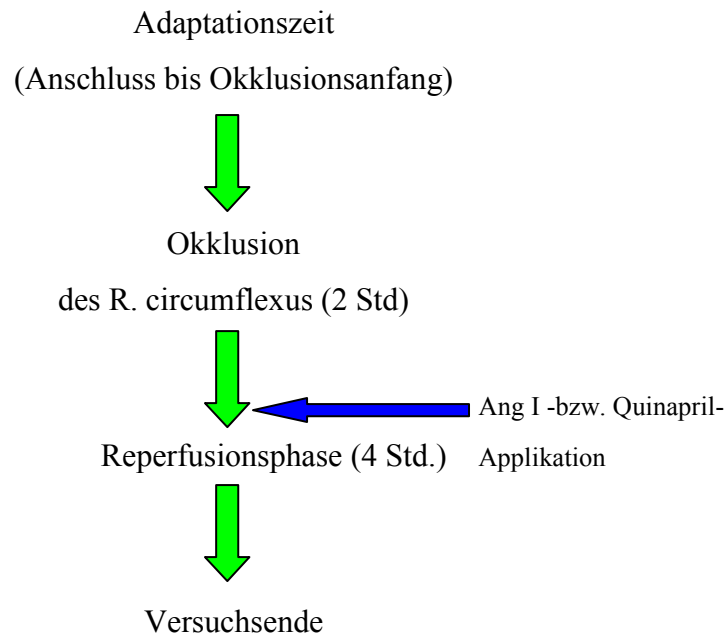


Abb. 15: Versuchsablauf mit Okklusion und Reperfusion (schematisch dargestellt)

4.4 Daten zur Etablierung der Methode, der klinischen Chemie und der Hämodynamik von normothermen isolierten Schweineherzen

Die im Ergebnisteil dargestellten Werte zeigen die Situation zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Basiswert zeigt die Ausgangssituation zum Perfusionsbeginn. Der Infarktanfangswert wird nach 1 Stunde Perfusion bestimmt. Nach weiteren 2 Stunden Okklusionsphase ergibt sich der Wert für das Infarkt-Ende. Daran schließt sich die Reperfusion an. Der letzte Wert beschreibt die Situation nach weiteren 2 Stunden Reperfusion. Alle ausgewerteten Herzen werden über einen Zeitraum von 7 Stunden und mehr perfundiert. Die Darstellung von Werten als Verlauf während eines Versuchs ist in Kapitel 5 dargestellt

4.5 Statistik

Es werden die Programme SPSS 12 und Excel (2003) benutzt. Die Grafiken werden mit Hilfe des Programmes Sigma Plot[®] (Version Windows 8.0) erstellt. Für die statistische Auswertung werden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Die 5 Versuchsgruppen können unter Anwendung eines statistischen Lagetests miteinander verglichen werden. Aufgrund der relativ geringen Versuchsanzahl der verschiedenen Gruppen ist die Untersuchung auf Normalverteilung, welche in der Natur auch nur sehr selten vorkommt (www.fh-friedberg.de/users/mlutz/JavaKurs/applets/Gaussfit/Normalverteilung), der einzelnen Werte hier nicht sinnvoll. Um eine Vergleichsmöglichkeit mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten zu schaffen, wird der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrisches Verfahren zwischen den Gruppen zum jeweils gleichen Zeitpunkt angewendet. Es werden die Ergebnisse der Versuchsgruppen statistisch ausgewertet und verglichen. Mit einem Wert von $p < 0,05$ wird eine Signifikanz akzeptiert. Im Ergebnisteil finden sich Mittelwert, Standardabweichung sowie Signifikanzen in tabellarischer Form und werden im Text beschrieben.