

3. Materialien und Methoden

a) isolierte Organperfusion

3.1 Versuchsorgane:

Die für die Versuche benötigten Rinderextremitäten stammten von dem Schlachthof Kasel-Golzig in Brandenburg. Sie wurden, mit Genehmigung des verantwortlichen Tierarztes, aus dem regulären Schlachtprozess gewonnen, d.h. die Tiere wurden vor der Schlachtung einer Schlachtieruntersuchung, geregelt in der Fleischhygieneverordnung Anlage 1, Kapitel I, Absatz 2, unterzogen, um Störungen des Allgemeinbefindens und auf Mensch und Tier übertragbare Krankheiten auszuschließen. Abbildung 3.1 beinhaltet die darüber hinaus gehenden Anforderungen:

Abbildung 3.1: Anforderungen an die Schlachttiere

Nutzungsart des Tieres	Milchrind
Alter	> 24 Monate
Geschlecht	weiblich
Klauen	frei von pathologischen Veränderungen

Zusätzlich wurde festgelegt, dass nur Vordergliedmaßen verwendet werden. In erster Linie deshalb, weil die häufigsten pathologischen Veränderungen, die eben nicht immer makroskopisch und äußerlich sichtbar sind, eher an der Hintergliedmaße auftreten, aber auch, weil die Vordergliedmaßen im Schlachtablauf wesentlich früher abgetrennt werden (etwa 3 Minuten nach der Tötung, Hintergliedmaßen nach etwa 10 Minuten), so dass der Zeitraum der warmen Ischämie möglichst kurz gewählt wurde. Aus morphologischer und biologischer Sicht bestehen keine für die Untersuchung relevanten Unterschiede zwischen den Klauen der Vorder – und Hintergliedmaßen, die für das Modell und die damit geplanten Untersuchungen relevant sein könnten.

Diese Gliedmaßen wären sonst als „nicht tauglich“ nach FIHV Anlage 1, Kapitel IV, Absatz 11 verworfen worden. Der Tierkörper wurde der normalen Zerlegung zugeführt.

3.2 Messgeräte zur Perfusion

Hemoximeter OSM

Mit diesem Gerät der Firma Radiometer Copenhagen wurden in 0,5 stündlichen Abständen Hämoglobinwert, Hämatokrit und die Sauerstoffsättigung des arteriellen und venösen Perfusats gemessen.

Blutgasanalysegerät (BGA) ABL 555

Mit Hilfe dieses Gerätes (Radiometer Copenhagen) wurden in 0,5 stündlichen Abständen sowohl die Blutgase, als auch die Elektrolyte und der pH-Wert im Perfusat und Dialysat gemessen.

3.3. Versuchsaufbau

Bei dem verwendeten Aufbau handelte es sich um eine Perfusionsapparatur der Firma Vitrotec Entwicklungs GmbH, Berlin, die ursprünglich für die Perfusion von isolierten Schweinegliedmaßen entwickelt wurde und für die Perfusion der isolierten Rindergliedmaße entsprechend modifiziert wurde. Der verwendete Aufbau bestand aus drei Kreisläufen, einem Perfusat-, einem Dialysat- und einem Wärmekreislauf (siehe Abbildung 3.3).

Wärmekreislauf:

Über den Heizstab (aus Metall) im Dialysatreservoir (aus Plexiglas), der von warmem Wasser über einen Zu- und einen Ablauf durchströmt wurde, fand die Erwärmung des Dialysates auf den gewünschten Temperaturbereich (39°C) statt.

Dialysatkreislauf:

Dem Kreislauf konnten über das Dialysat neben Sauerstoff und Glucose auch Calcium und - je nach Fragestellung - verschiedene wasserlösliche Substanzen zugeführt werden. Das Dialysat stand mit dem Dialysem modul F7 low flux (Fresenius medical care, Bad Homburg, Hemoflow F-Series low flux Polysulfon capillary), ebenfalls über einen zu- und einen abfließenden Schlauch, in Verbindung. Dort fand über die Membran (Oberfläche 1,6 m², Porengröße 5000 Dalton) ein Gas- (Sauerstoff, Kohlendioxid) bzw. Stoffaustausch (Elektrolyte, Glucose, Pyruvat und Laktat) statt. Zu diesem Zweck strömte auf der einen Seite der Membran das venöse Perfusat, auf der anderen Seite das Dialysat. Dieser Gas- bzw. Stoffaustausch entlang des Konzentrationsgefälles erfolgte bis zum Konzentrationsausgleich (Hämodialyse), wobei die Filtration des Perfusates druckabhängig (transmembran pressure: TMP, u.a. vom Perfusionsfluss abhängig) war, das heißt, je höher der Druck, desto höher der Moleküldurchtritt.

Perfusatkreislauf:

In der Extremitätenhalterung aus Plexiglas wurde das aus der Extremität frei abfließende venöse bzw. kapilläre Perfusat aufgefangen und über einen Schlauch in das Perfusatreservoir geleitet. Von dort aus beförderte die Rollpumpe 1 das Perfusat über einen Filter in das Dialysem modul. Dort wurde es durch Stoffaustausch und Erwärmung aufbereitet. Mit Hilfe der Rollpumpe 2 gelangte das „arterialisierte Perfusat“ über die Luftfalle in die Arteria metacarpea dorsales III und Arteria digitales palmares communes III des isolierten Beines. Zur online- Überprüfung (also real time Überwachung auf einem Monitor) bestimmter Parameter wurden verschiedene Messfühler in das System eingebracht. Auf diesem Wege konnten neben Perfusionsdruck und – fluss auch Perfusat- und Dialysattemperatur gemessen werden. Außerdem fand während des gesamten Versuchsverlaufes ein Monitoring von pH-Wert und Perfusatgewicht statt. Zur Optimierung der Hämoglobinkonzentration konnten die Rollpumpen auf unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten eingestellt werden. Durch eine erhöhte Geschwindigkeit der Rollpumpe 1 im Verhältnis zur Rollpumpe 2 kam es zu einem Druckanstieg im Dialysem modul. Dadurch wurde Flüssigkeit aus dem Perfusat abgepresst, was wiederum zur Eindickung des Perfusates führte. Die daraus resultierende Erhöhung der Hämoglobinkonzentration konnte anhand einer Gewichtsreduzierung des Perfusatreservoirs kontrolliert werden.

Abbildung 3.2: Versuchsaufbau – isoliert perfundierte distale Rinderextremität

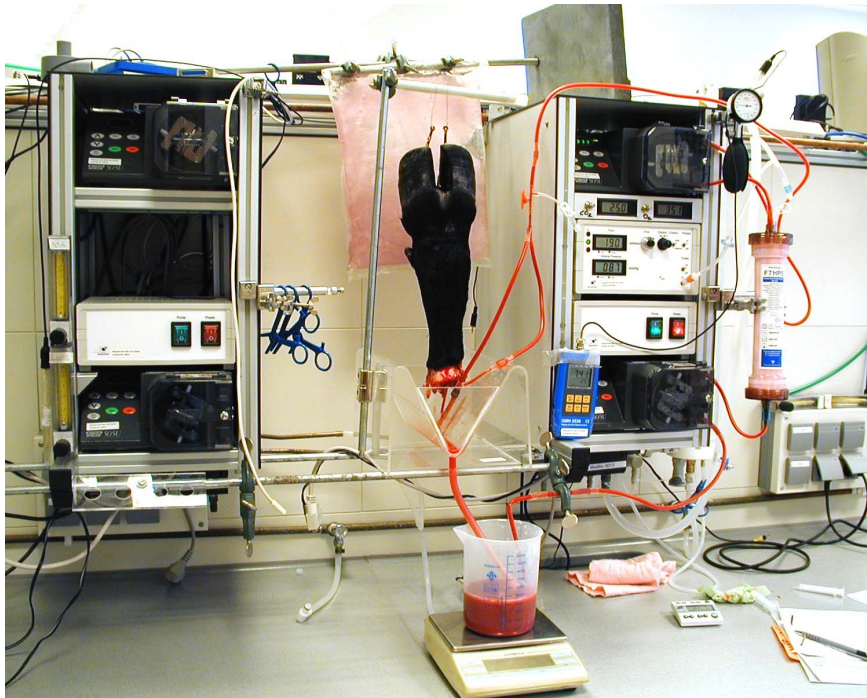
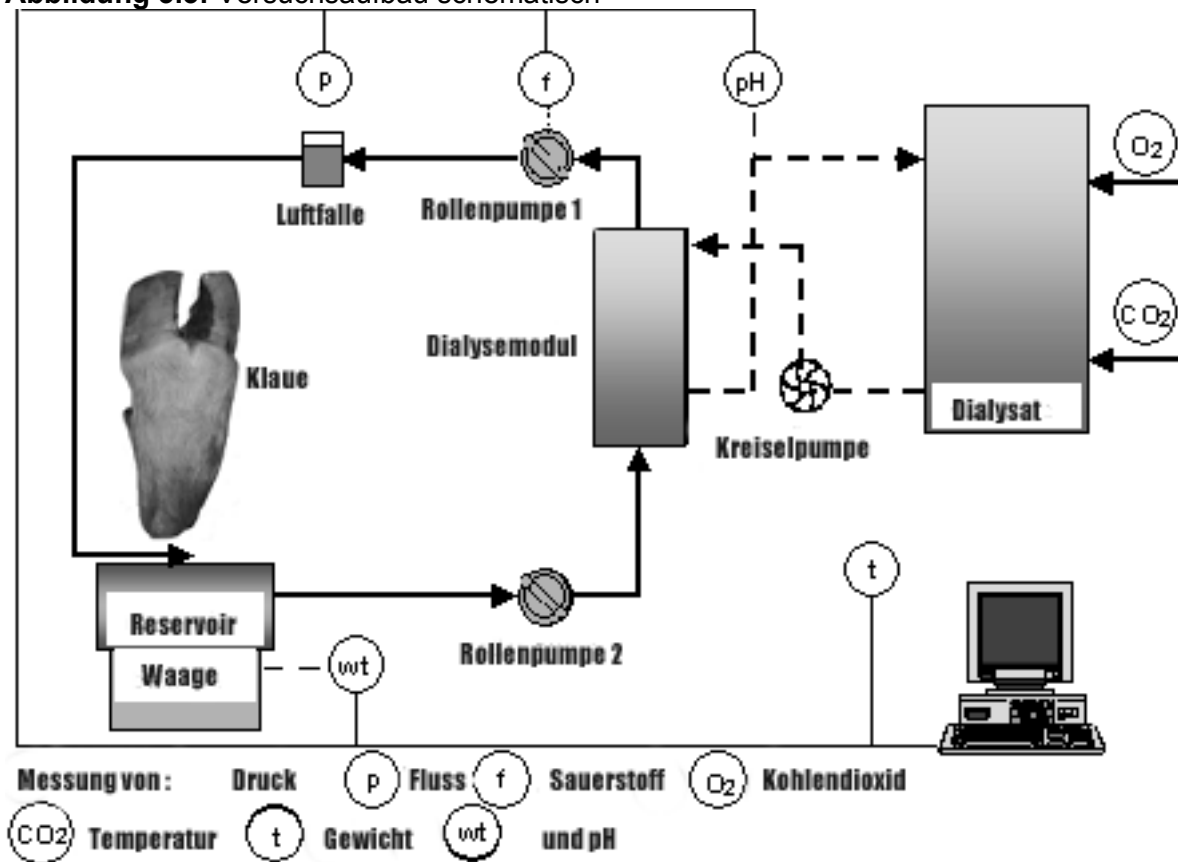


Abbildung 3.3: Versuchsaufbau schematisch



3.4 Versuchsablauf

3.4.1 Ablauf auf dem Schlachthof

Die Tiere wurden nach den gesetzlichen Richtlinien geschlachtet, das heißt, per Bolzenschuss betäubt und durch Blutentzug getötet. Es wurden etwa 500 ml Blut in einer Plastikflasche aufgefangen und mit 50 ml Citratpuffer (66 mmol/l Tri - Natrium Zitrat und 44 mmol/l Zitronensäure) vermischt. Natriumcitrat verhindert die Blutgerinnung; es inaktiviert Calcium durch Komplexbildung, wodurch eine Aktivierung der Gerinnungskaskade unterbleibt. Das Blut wurde bei Raumtemperatur in das Labor transportiert.

Nach dem Entbluten wurden die Gliedmaße am Karpalgelenk vom Tierkörper abgetrennt. Die Hauptarterie, A. digitalis palmaris communis III, wurde zuerst mittels einer 30 cm langen und stumpf angeschnittenen Heidelberger Verlängerung (MPL Medical – Produkte, Lichtenberg GmbH, Durchmesser 0,3 cm) als Katheter kanüliert und gespült. Darauf erfolgte die gleiche Prozedur mit dem kleineren dorsalen Gefäß, der A. metacarpea dorsalis III mit einer Spritzenpumpenleitung (Clinico, Bad Hersfeld, Durchmesser 0,2 cm), einer Ernährungssonde (Braun Melsungen AG, Durchmesser 0,15 cm) oder einem Venenkatheter (Braun Melsungen AG, Durchmesser 0,08 cm) je nach Kaliber. Die Spüllösung setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 1l Thomaejonin - Lösung Na 140 K4 (Delta Select GmbH, Dreieich)
- 40 ml 5 % Glukose (Serva, Heidelberg)
- 2 ml Heparin (= 10.000 I.E.) Liquemin N25000 (Ratiopharm GmbH, Deutschland)

Diese Bestandteile wurden gemischt, im Anschluss 8 Minuten mit 20 l/h medizinischem Sauerstoff begast und darauf bis zur Nutzung auf 4°C gekühlt. Im Schlachthof wurde 1 ml Insulin-Lösung (= 0,8 I.E.) zugesetzt. Die Insulin-Lösung bestand aus physiologischer Kochsalzlösung und Insuman – Insulin (Aventis Pharma, Frankfurt a.M.). Die Spülung erfolgte zur Vermeidung von Koagulationen im Gefäßsystem. Es wurde solange gespült, bis statt Blut klare Flüssigkeit austrat (ca. 500 ml). Für den Transport ins Labor wurde die Gliedmaße in ein OP-Tuch eingeschlagen und mittels Kühlakkus kalt gelagert. Die Zeit vom Entbluten bis zur Spülung betrug ca. 10 – 15 Minuten.

3.4.2 Vorbereitung im Labor

Die Dialysatlösung wurde zu jedem Versuch frisch angesetzt. Es wurden 3,7 l benötigt. Das Gemisch setzte sich wie folgt zusammen:

Saurer Bestandteil: Bedarf 106 ml

NaCl = 210,7 g (Merck, Darmstadt)

KCl = 5,22 g (Calbiochem., Darmstadt)

MgCl₂ x 6 H₂O = 3,56 g (Merck, Darmstadt)

CaCl₂ x 2 H₂O = 9,0 g (Merck, Darmstadt)

CH₃COOH = 6,31 g (Merck, Darmstadt)

Auf 1000 ml mit Millipore oder destilliertem Wasser aufgefüllt

Basischer Bestandteil:

10,836 g NaHCO₃

Die einzelnen Bestandteile werden jeweils mit der Analysenwaage abgewogen. 106 ml des sauren Bestandteils, 10,836 g NaHCO₃ und 30 ml Calcium (Braun Melsungen AG, Melsungen) werden zu 3552 g Millipore oder destilliertem Wasser gegeben.

Abbildung 3.4: Ionenkonzentrationen des Dialysates

Na ⁺ mmol/l	K ⁺ mmol/l	Ca ²⁺ mmol/l	HCO ₃ ⁻ mmol/l	PH
105-140	1,5-2,5	2 – 3,5	25-35	7,0-7,3

Die benötigte Blutmenge war von der Ausgangshämoglobinkonzentration abhängig, da das Vollblut zur Verbesserung der Fließeigenschaften auf eine Hämoglobinkonzentration von 7,5 bis 8 mg/ dl verdünnt wurde. Zur Berechnung der Blutmenge wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{8 \text{ (gewünschte Hämoglobinkonzentration) in g/ dl}}{\times 700 \text{ (gewünschte Flüssigkeitsmenge)/ Ausgangshämoglobinkonzentration in g/ dl}}$$

Eine zweite Gruppe wurde mit gewaschenem Blut perfundiert. Dazu wurde ein Gemisch aus 630 ml Dialysat, 10 % heterologen Erythrozyten und 4 % Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg) verwendet. Der Waschvorgang bestand aus 4 x Zentrifugieren, wonach jeweils der Überstand verworfen wurde. Zu den Erythrozyten wurde PBS-Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert.

Nachdem das Vollblut/ gewaschene Blut in ausreichender Menge in das Reservoir gefüllt wurde, wurde der pH Wert kontrolliert und erforderlichenfalls nachgeregelt (Kohlendioxidkonzentration wird erhöht bei pH > 7,45 bzw. gesenkt bei einem pH < 7,35). Außerdem wurde die Begasung so eingestellt, dass die Sauerstoffsättigung im arteriellen Perfusat 99 - 100 % betrug, um somit eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sicherzustellen (KLÖVENKORN, 1990).

3.4.3 Perfusionsversuch

Phase I (Adaptation und Aquilibrierung)

Die Extremität wurde langsam über den Zeitraum von einer Stunde an das System adaptiert. Der Perfusionsfluss wurde innerhalb der ersten 10 Minuten nur so hoch eingestellt, dass ein Druck von 60 mmHg nicht überschritten wurde. Erst innerhalb einer Adaptationsphase von einer Stunde sollte der Endfluss erreicht werden. Dadurch kann eine Ödematisierung des Gewebes in der noch kalten Gliedmaße vermieden werden (MÜLLER, 1989). Bei den ersten sechs Perfusionen wurde der Fluss so lange erhöht, bis sich ein Druck von 100 mmHg eingestellt hatte. Da die Gliedmaßen zum Teil jedoch sehr unterschiedliche Gefäßkaliber aufwiesen, variierten die Flussraten extrem. Die histologische Untersuchung zeigte, dass Flussraten über 200 ml/ min zu starken Gefäßdilataionen und Gefäßwandschäden führten. Danach wurden sechs Perfusionen bei einem Endfluss von 200 ml/ min durchgeführt und zum Vergleich vier Perfusionen mit einem Fluss von 190 ml/ min, wobei der resultierende Druck notiert wurde. Nach Auswertung der Kontrollparameter ergab sich, dass der Druck 150 mmHg nicht überschreiten darf. Messungen von ROBINSON (1974) und SCOTT (1978) ergaben für das Pferd ebenfalls diesen Richtwert. Auch histologische Untersuchungen zweier Perfusionen, die 150 mmHg überschritten, zeigten artifizielle Veränderungen, so dass dieser Wert als Höchstwert festgelegt wurde.

Die Gliedmaßen, die mit Vollblut perfundiert wurden (4), wurden 2 x bei 120 ml/ min und 2 x bei 100 ml/ min perfundiert, da sich sonst kein Druck unter 150 mmHg einstellen ließ.

Phase II (Versuch)

Zu Perfusionsbeginn (Stunde 0) und dann in 0,5 stündlichen Abständen wurden Perfusat- (venös) und Dialysatproben entnommen. Je nach Abweichung von dem gewünschten Bereich wurde die Hämoglobinkonzentration mit Hilfe der Rollpumpen nachgeregelt. Durch die Kohlendioxidkonzentration konnte der pH Wert reguliert werden.

Zur Bestimmung der Laktat-, Pyruvat- und Glucosekonzentration wurden in stündlichen Abständen, ab Perfusion 22 nach 0, 5 h und 2 h sowie 3, 5 h und 5 h, Proben (2 ml Perfusat in ein Na - Fluoridröhrchen) aus dem venösen Kreislauf entnommen.

Nach einer Stunde wurde in der Experimentalphase (ab Perfusion 21) die Versuchssubstanz zugegeben bzw. der zu testende Parameter verändert.

Glukosesubstitution:

In den ersten Perfusionen wurde die Glukoseapplikation vom Modell der Schweinegliedmaße übernommen. Es wurden jede Stunde 20 ml 5 %ige Glukoselösung (1 g Glukose) hinzuge-

fügt und nach 0,5 Stunden und nach 4 Stunden 0,8 I.E. Insulin. Die Analysen der Perfusatsproben zeigten eine starke Hyperglykämie. Aufgrund der geringen Muskelmasse hat die Rindergliedmaße offensichtlich keinen großen Nährstoffbedarf. Der Bedarf nach dem Transport vom Schlachthof in das Labor war sehr hoch. Es wurden vier Perfusionen mit einer einmaligen Gabe von 40 ml 5 %iger Glukoselösung (2 g Glukose) zur Stunde 0 durchgeführt. Nach Verlängerung der Perfusionszeit auf 5 Stunden wurden in Perfusion 10 zusätzlich 20 ml 5 %ige Glukoselösung (1 g Glukose) nach 2,5 Stunden verabreicht.

Die optimale Substitution erfolgte zur Stunde 0 mit 40 ml Glukose 5 %ig (2 g) ebenso nach 2 h, 3 h, 3,5 h und 4 h 5 ml (0,25 g). Insulin wurde nach 0,5 Stunden und nach 3,5 Stunden zugegeben. Diese Substitution erfolgte in allen weiteren Perfusionen, außer den Vollblutperfusionen P13, 14, 15, 16, diese erhielten lediglich 36 ml 5 %ige Glukoselösung zur Stunde 0.

3.5 Perfusion unter nicht physiologischen Bedingungen

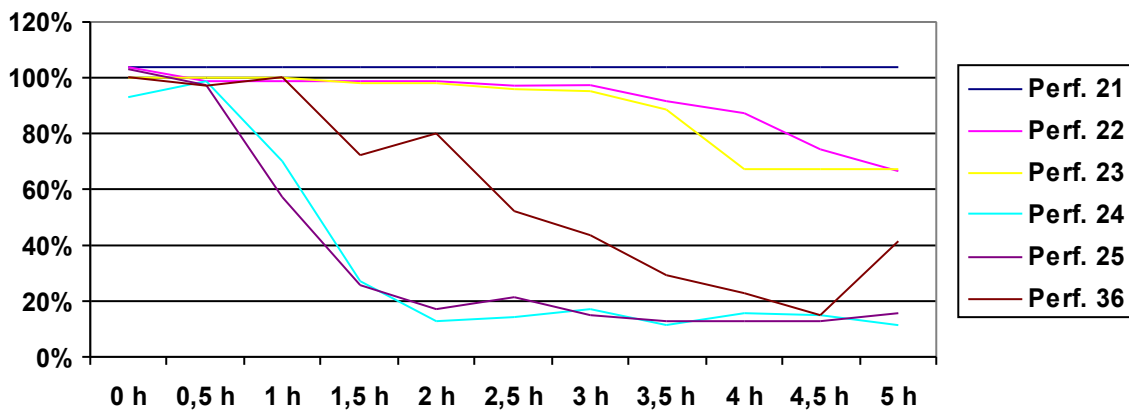
3.5.1 Perfusion unter Sauerstoffdefizit

Für die Perfusion 21 wurde die Sauerstoffversorgung um die Hälfte reduziert, d.h. es wurde mit 175 ml/ min begast. Da die Sauerstoffsättigung weiterhin 100 % betrug, wurde diese Versuchsanordnung nicht wiederholt.

Während der Perfusionen 22 und 23 wurde die Sauerstoffbegasung abgeschaltet. Die Sauerstoffsättigung war nach 5 Stunden immer noch 67,5 (Perfusion 22) und 67,9 % (Perfusion 23).

Während der Perfusionen 24, 25 und 36 wurde, um eine Sauerstoffanreicherung des Perfusates und/ oder des Dialysates durch die Umgebungsluft zu verhindern, die Kontaktfläche auf ein Minimum reduziert. Nach ca. 2 Stunden sank die Sättigung gegen 0. Die Sauerstoffbegasung wurde dann manuell nach Bedarf der Klaue bei einer Sättigung von 15 – 30 % gehalten.

Abbildung 3.5: Sauerstoffsättigung während der Perfusion



3.5.2 Perfusion mit reduzierter Flussrate

Die Perfusionen 26, 27 und 45 wurden mit einem Fluss von 50 % perfundiert. Das entspricht einer Flussgeschwindigkeit von 95 ml/ min. Die Perfusionen 28, 29 und 47 wurden mit einem Fluss von 25 % perfundiert. Das entspricht einer Flussgeschwindigkeit von 47/48 ml/ min.

3.5.3 Perfusion unter Noradrenalinzugabe

In Perfusion 32 wurde nach dem Vorbild von NOGUEIRA et al. (1999) die Gefäßreaktivität des Beines getestet. Es wurde nach einer Stunde 0,02 µg Noradrenalin (Fa. Sigma - Albrich, Schnelldorf) zugegeben, nach 1 h und 40 min wurden 0,06 µg, nach 1 h 45 min 2 µg, nach 2 h 15 min 0,2 µg und nach 2 h 35 0,1 µg i. a. zugegeben.

Abbildung 3.6: Noradrenalinzugabe

1 h 15 min	0,02 µg
1 h 40 min	0,06 µg
1 h 45 min	2 µg
2 h 15 min	0,2 µg
2 h 35 min	0,1 µg

3.5.4 Perfusion unter Histaminzugabe

Auf der Grundlage der von NILSSON (1963) gemessenen Histaminwerte bei akut Rehe kranken Milchkühen wurden in Perfusion 33 einmalig 2 mg Histamin 96 %ig (Fa. Sigma – Albrich, Schnelldorf) in den Perfusatkreislauf (i.v.) appliziert. Aufgrund des extrem starken Druckanstiegs über die Kapazität der Apparatur hinausgehend konnte die Perfusion nicht zu Ende geführt werden. Da aus NILSSONs (1963) Arbeiten hervorgeht, dass es sich um einen langsamen Anstieg der Histaminkonzentration im Blut handelt, wurde in den weiteren Perfusionen mit Histaminzugabe dieser Zustand imitiert. In Perfusion 34 wurden nach einer Stunde 25 µg i.v. appliziert, nach 1,5 Stunden 50 µg, nach 2 Stunden 50 µg, nach 2,25 Stunden 75 µg, nach 2,5 Stunden 200 µg, nach 3 Stunden 200 µg, nach 3,5 Stunden 400 µg und nach 4,5 Stunden 1 mg. In Perfusion 38 wurden nach 1 Stunde 200 µg Histamin, nach 1,5 Stunden 250 µg, nach 2 Stunden 300 µg, nach 2,5 Stunden 350 µg, nach 3 Stunden 400 µg, nach 3,5 Stunden 450 µg, nach 4 Stunden 500 µg und nach 4,5 Stunden 550 µg (siehe Abb. 3.7) zugegeben.

Abbildung 3.7: Histaminzugabe

Perfusion 34		Perfusion 38	
1h	25 µg	1 h	200 µg
1,5 h	50 µg	1,5 h	250 µg
2 h	50 µg	2 h	300 µg
2,25 h	75 µg	2,5h	350 µg
2,5 h	200 µg	3 h	400 µg
3 h	200 µg	3,5 h	450 µg
3,5 h	400 µg	4 h	500 µg
4,5 h	1 mg	4,5 h	550 µg

3.5.5 Perfusion unter Endotoxinzugabe

Unter Berücksichtigung der Literaturangaben von WALDRON et al. (2003), OLSON et al. (1995) und SINGH et al. (1994) wurde während der Perfusionen 35, 41 und 48 Endotoxin 055: B5 (Fa. Sigma – Albrich, Schnelldorf) zugegeben. 1 mg Endotoxin wurde in 40 ml Dialysatflüssigkeit verdünnt. Nach einer Stunde wurden alle 5 Minuten 3 ml Endotoxin - Dialysatlösung appliziert (das entspricht 75 µg).

3.5.6 Perfusion unter Laktatzugabe

Die Perfusionen 37 und 40 wurden unter Applikation von 2 g L- Lactic Acid Free Acid (Fa. Sigma – Albrich, Schnelldorf) durchgeführt. Die Applikation (i.v.) erfolgte nach einer Stunde Adaptationszeit. Die Dosierung erfolgte unter Berücksichtigung der Literaturangaben von MORI et al. (1997) und TRABOLD et al. (2003).

3.5.7 Perfusion unter Laktat – und Noradrenalinzugabe

Laut Literaturangaben (MORI et al., 1997; TRABOLD et al., 2003) handelt es sich bei Laktat um einen Vasodilatator. Da während der Spülung des Gefäßsystems im Schlachthof eine Erschlaffung der großen Gefäße sichtbar wird, soll eine Dauertropfinfusion mit Noradrenalin einen Basistonus/ Präkontraktion der Gefäße sicherstellen (DETTMANN et al., 2003). In Perfusion 46 und 51 wurde nach einer Stunde Adaptationszeit 1 µg/ min Noradrenalin (Fa. Sigma – Albrich, Schnelldorf) als Dauertropfinfusion i.a. für die gesamte Perfusionsdauer angeschlossen. Nach 1,5 Stunden wurden 2 g L-Lactic Acid Free Acid (Fa. Sigma – Albrich, Schnelldorf) i.v. eingegeben.

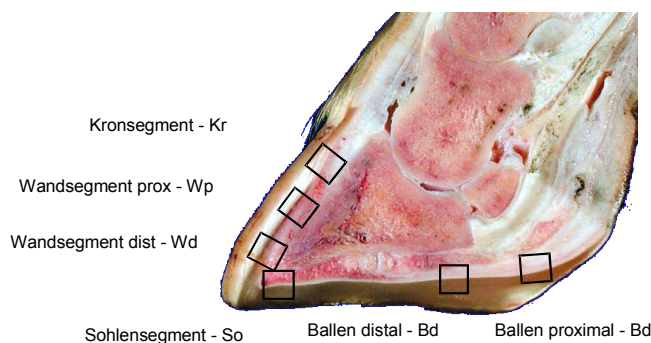
b) Morphologische Untersuchung

3.6 Probengewinnung

Proben für die histologische und zytologische Untersuchung:

Unmittelbar nach Beendigung der Perfusion wurde mit einer Bandsäge aus jeder Klaue eine Sagittalscheibe herausgesägt. Aus jedem Segment wurden ein bis zwei Blöckchen (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) für die lichtmikroskopische Untersuchung in 4 % neutral gepuffertem Formalin und für die Elektronenmikroskopie (Blöckchengröße 2 x 2 x 5 mm) in Karnovski's Lösung fixiert.

Abbildung 3.8: Probeentnahmestellen



3.7 Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung

Lichtmikroskopische Untersuchung:

Nach 24 Stunden Fixation wurden die Proben 30 Minuten gewässert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol überführt, über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C im Paraffinbad gelagert und dann in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöckchen wurden mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert - Jung, Heidelberg) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, im Wasserbad gestreckt und auf mit Silane beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach einer Trocknungszeit von 2 – 4 Stunden wurden die Schnitte Hämatoxylin - Eosin nach Meyer gefärbt.

Elektronenmikroskopische Untersuchung:

Nach 24 Stunden Fixation in Karnovsky's Medium wurden die Proben mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gespült und in 1 %iger Osmiumtetroxidlösung (Fa. Roth, Karlsruhe) über Nacht durch Immersion nachfixiert. Darauf folgte auch hier eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Als Intermedium wurde Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Die Einbettung in den Kunststoff erfolgte allmählich durch ein Propylenoxid/ Agargemisch im Verhältnis 1:1 und am nächsten Tag in ein reines Agargemisch (Agar Scientific, Stansted, UK). Die Polymerisation des Kunststoffes fand im Brutschrank bei 50°C statt. An einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) wurden mit Glasmessern 1 µm dicke Semidünnschnitte von den Blöckchen abgenommen und mit der Färbelösung nach Richardson (1 % Methylblau - Azur - II - Lösung) angefärbt, um lichtmikroskopisch den optimalen Bezirk für

die Ultradünnschnitte auswählen zu können. Diese wurden dann mit einem Ultramikrotom mit Diamantmesser (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) in einer Dicke von 50 bis 60 nm hergestellt, auf befilmten Kupferringblenden aufgefangen und nach VENABLE und COGGESHALL (1965) mit Bleizitrat schnittkontrastiert.

Beurteilt werden sollte sowohl in der licht- als auch in der elektronenmikroskopischen Untersuchung die Vitalität des Gewebes, wobei besonderes Augenmerk auf die bei Hypoxie am empfindlichsten reagierenden Zellen in diesem Gewebeverband, hier die Zellen des Stratum basale und die Endothelzellen der Gefäße, sowie in der Zelle auf die empfindlichsten Zellorganellen, die Mitochondrien, gelegt wurde. Außerdem waren druck- und flussbedingte Schädigungen aufgrund der Perfusion sichtbar. Das sind Dilatationen der Gefäße, Ödeme, Extravasate aber auch Thrombenbildungen. Gerade die frühen regressiven Veränderungen, wie Kernverklumpung und Mitochondrienschwellung sind nur im elektronenmikroskopischen Schnitt zu beurteilen. Abbildung 3.9 gibt das Beurteilungsschema wieder. Die postmortalen Veränderungen sind nach ihrem zeitlichen Ablauf sortiert (COTRAN, KUMAR, COLLINS; 1999).

Abbildung 3.9: Lichtmikroskopische Befunde zur Beurteilung der Perfusionsqualität

Zeitlicher Ablauf der Ereignisse bei einer Nekrose
keinerlei Zellschäden
Pyknose des Nucleolus
Kernwandhyperchromatose, Kernschwellung
Karyopyknose, -rrhexis oder Koagulation des Zytoplasmas, Gefäßmigration von Leukozyten
Verlust der Zellkonturen, Zellschrumpfung, Spaltenbildung
Ödem der Matrix, Kollagenolyse (Eosinophilie bzw. Nekrose)
Andere Veränderungen
Dilatierte Gefäße
Erythrozyten in Gefäßperipherie aufgrund von zu hohem Perfusionsdruck
mechanische Zerreißen (Artefakt)
Thromben
Lösung der dermoepidermalen Verbindung
Ödem
Entzündung

Abbildung 3.10: Elektronenmikroskopische Befunde zur Beurteilung der Perfusionsqualität

Zeitlicher Ablauf der Ereignisse einer Nekrose
keinerlei Zellschäden
Kernverklumpung
Mitochondrienschwellung
Chromatinmigration
Lysosomen -& Ribosomenauflösung
Zellödem, Schwund der Organellen, Kernaflösung
Strukturaflösung von Zytoplasma & Kern

3.8 Thermographie zur Überwachung der Perfusion

Mit Hilfe der Thermographie wird die Oberflächentemperatur eines Objektes durch Messung der von ihm emittierten Infrarotstrahlung bildhaft dargestellt. In der Diagnostik eher zur Darstellung von „Hot spots“, d.h. vermehrt warmer Bezirke (Entzündung) verwendet, wird diese Technik hier in der Etablierungsphase zur Auffindung von „Cold spots“ (Auffinden ischämischer Bezirke) verwendet. Benutzt wurde die Infrarot-Thermographiekamera „VARIOSCAN COMPACT LW 3011 von Jenoptik“ mit einem eingestellten Emissionsfaktor von 0,98 und einem Kamera-Objekt- Abstand von 1-2 Metern. Direkte Sonneneinstrahlung oder Zugluft wurden verhindert und der Bereich hinter der Klaue wurde heruntergekühlt, um den für eine genaue Messung erforderlichen Temperaturgradienten zu erzeugen. Die Klaue wurde alle 0,5 Stunden photographiert.

3.9 Spezielle Untersuchungstechniken in der Experimentalphase

HypoxyprobeTM- 1 Kit zur Detektion von Gewebehypoxie (Pimonidazol von Chemicon, USA und Kanada)

Der Marker besitzt eine heterozyklische Nitroverbindung (Nitroimidazol). Es handelt sich dabei um eine Substanz, die durch intrazelluläre Nitroreduktasen zu einem Nitroradikal- Anion reduziert wird (BEGG et al., 1983), das anschließend an ein Makromolekül (in erster Linie RNA) der Zelle bindet. Hierbei ist das reduzierte Anion für diesen Bindungsvorgang nur in Abwesenheit von Sauerstoff ausreichend stabil, so dass die Bindung dieser aromatischen Nitroverbindung nur in hypoxischen bzw. anoxischen Zellen möglich ist (MILLER et al., 1982).

In den Perfusionen 19 und 21 sollte ein physiologisches Zellbild als Referenz dargestellt werden. Perfusion 24 fand unter Sauerstoffdefizit statt. Mit Hilfe des Hypoxiemarkers sollte festgestellt werden, ob spezielle Regionen der Klaue eine stärkere Hypoxie zeigen als andere.

HypoxyprobeTM – 1 (333 mg Pimonidazol) wurde bei allen drei Perfusionen nach einer Stunde ins Perfusat eingegeben. Für die Immunfärbung wurden ebenfalls 5 µm dicke Mikrotomschnitte von den Paraffinblöckchen verwendet. Das Gewebe wurde entparaffiniert und in den Dako Cytomation Autostainer (Dako Cytomation, Hamburg) eingegeben.

Abbildung 3.11: Immunhistochemische Technik (bei Raumtemperatur) zum Nachweis von Gewebehypoxie

Arbeitsverfahren	Zeit in min	Reagenz	Bemerkung
Waschen	2	destilliertes Wasser	
Waschen	2	PBS	1
Zerstörung der Gewebe – peroxidase	5	3% H ₂ O ₂ in destilliertem Wasser (750 µl/ Objekt - träger)	2
Antigenrückgewinnung	40	0,01% Pronase (300 µl/ Objektträger)	3
Waschen	2	PBS	
nicht spezifische Bindung blocken	5	DAKO blocking solution (300 µl/ Objektträger)	4
1° Mab	40	Hydroxyprobe- 1 Mab (1/50) (300µl/ Objektträger)	5
Waschen	2	PBS	
2° Antikörper	10	Biotin - konjugiertes F(ab`) ₂ (1/200) (300 µl/ Objekt - träger)	6
Waschen	2	PBS	
Peroxidase	10	Streptavidin peroxidase (500 µl/ Objektträger)	7
Waschen	2	PBS	
Peroxidase Chromagen	10	DAB (500 µl/ Objektträger)	8
Waschen	2	PBS	
Gegenfärbung	0,5	Aqua Hematoxylin	9
Waschen	2	destilliertes Wasser	

Anschließend wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen und mit Eukitt eingedeckt.

Erläuterung der Bemerkungen aus Abb. 3.11:

1. PBS = phosphat buffered saline, 10 mM (Dako Cytomation Wash Buffer, Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
2. 3 % H₂O₂ als Verdünnung von Analytical Reagent 31,3 % H₂O₂ (Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
3. Biomedica Pronase (Fa. Fisher Scientific, Schwerte)
4. Serum freier Proteinblocker (Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
5. 1°Mab (Monoklonaler Antikörper IgG₁, der an HypoxyprobeTM – 1 gebundenen Proteinen bindet, Fa. Chemicon, USA und Kanada) 1/ 50 verdünnt in 10 mM PBS und einem Tropfen Dako Proteinblockerlösung/ ml (5292 µl ChemMateTM Antibody Diluent, Dako Cytomation, Hamburg + 108 µl Ak1)
6. Biotin - SP- Konjugiertes F(ab`)₂ Fragment von einem rabbit anti - mouse IgG (Fa. Dako Cytomation, Hamburg) verdünnt 1/ 200 in 10 mM PBS und einem Tropfen Proteinblockerlösung/ ml (5671,5 µl ChemMateTM Antibody Diluent + 28,5 µl Ak2)
7. Streptavidin konjugierte Peroxidase (Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
8. Liquid 3,3`- diaminobenzidin Reagenz (ChemMateTM DAB und Chromagen, Fa. Dako Cytomation, Hamburg)
9. Aqua Hematoxylin (Fa. Dako Cytomation, Hamburg)