

METHODIK

Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des selektiven α_1 -Agonisten Methoxamin auf isoliert arbeitende Linksherzpräparate von Ratten und Meerschweinchen beiderlei Geschlechts untersucht. Die Versuchstiere stammten aus der institutseigenen Zucht. Für einen Versuch (Dauer insgesamt ca. 8 Std., Perfusionsdauer 2-3 Std.) wurde jeweils das Herz eines Tieres präpariert und in die Versuchsanlage integriert, sodann wurde unter kontinuierlicher Aufzeichnung verschiedener Funktionsparameter (u.a. linksventrikulärer Druck LVP, Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel $LVdP/dt_{max}$, Druckabfallgeschwindigkeit $LVdP/dt_{min}$, Koronarfluß, Herzfrequenz) Methoxamin in kumulativer Dosierung in die das Herz durchströmende Perfusionsflüssigkeit gemischt.

Die Versuche wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

Aufbau der Versuchsanlage

Der Versuchsaufbau basiert auf Angaben von Langendorff (1895) und Neeley et al. (1967). Er dient zur Untersuchung von isolierten, d.h. vollständig vom Tierkörper getrennten, arbeitenden Linksherzpräparaten. Der Lungenkreislauf wurde nicht untersucht, daß rechte Herz warf das eingeströmte Koronarovolumen aus. Als Blutersatz diente eine modifizierte Krebs- Henseleit-Lösung (Beschreibung s.u.), welche vor Versuchsbeginn jeweils über einen Filter in alle drei Vorratsgefäße der Anlage gefüllt und mit Hilfe der Pumpen bläschenfrei in sämtliche Leitungen befördert wurde.

Die Anlage besteht aus drei Kreisläufen (siehe Abb. 4): dem sog. Langendorffkreislauf, der während der Präparation (Beschreibung s.u.) benutzt wurde, dem eigentlichen Versuchskreislauf, sowie dem Sauerstoff-Eichkreislauf, der nur während der Eichung eingeschaltet war.

Der Langendorffkreislauf besteht im wesentlichen aus einem Wasserreservoir, welches ca. 1m über dem Herzen angebracht ist und durch hydrostatischen Druck während der Präparation das Herz retrograd über die Aorta mit der Versuchslösung versorgt. Der ausgeübte Druck wurde mit einem Statham - Manometer P23DB gemessen und ließ sich mit einer

zwischen geschalteten Schraubklemme stufenlos regulieren. Das abtropfende Perfusat wurde in einem Meßbecher aufgefangen und von dort in das Langendorffgefäß zurückgepumpt.

Der Hauptkreislauf teilt sich in ein zuführendes und ein abführendes Segment. Das Perfusat gelangte aus dem Hauptreservoir über den zuführenden Schenkel in den linken Vorhof und den linken Ventrikel. Zentrales Element des zuführenden Segments ist eine stufenlos regulierbare Quetschrollpumpe, die dem linken Ventrikel des Herzens gleichmäßig das Perfusionsmedium (Beschreibung s.u.) aus dem Hauptreservoir zuführte. In dieses Hauptreservoir wurde während des Versuches das Methoxamin eingespritzt. Um Druckschwankungen zu dämpfen und etwaige Luftbläschen abzufangen war zwischen Pumpe und Herz ein Windkessel eingebaut, ebenso wie ein Filter (Zellulose-Nitrat-Filter und Glasfaser-Prefilter, Porengröße: 3.0 µm, Sartorius AG, Germany), der kleinste Schwebeteilchen zurückhielt. Der zuführende Teil endete mit einer Kanüle im linken Vorhof und war mit einem Druckwandler verbunden, der eine Messung des Vorhofdruckes zur Beurteilung der Vorlast ermöglichte.

Das abführende Segment führte den koronarvenösen und den aortalen Auswurf über separate Leitungen zurück in das Hauptreservoir. Der aortalen und der koronarvenösen Leitung wurde von jeweils einer Quetschrollpumpen ein kleiner Teil des Perfusats abgezweigt und an Sauerstoff - Meßelektroden vorbeigeführt zur Bestimmung des aortalen bzw. koronarvenösen Sauerstoffpartialdruckes.

Der aortale Auswurf erfolgte zunächst in einen zweiten Windkessel, in dem sich ein Temperaturfühler sowie der Anschluß zu einem Statham - Manometer zur Bestimmung des aortalen Druckverlaufs befand. Zur Messung des Aortenflusses war im weiteren Leitungsverlauf ein Flowmeter eingeschaltet. Der Aortendruck bzw. die Nachlast wurde mit Hilfe eines durch ein Quecksilbermanometer komprimierbaren Schlauchstücks (Starling - Widerstand), das nach dem Flowmeter in den Kreislauf eingeschaltet war, während des Versuchs konstant gehalten.

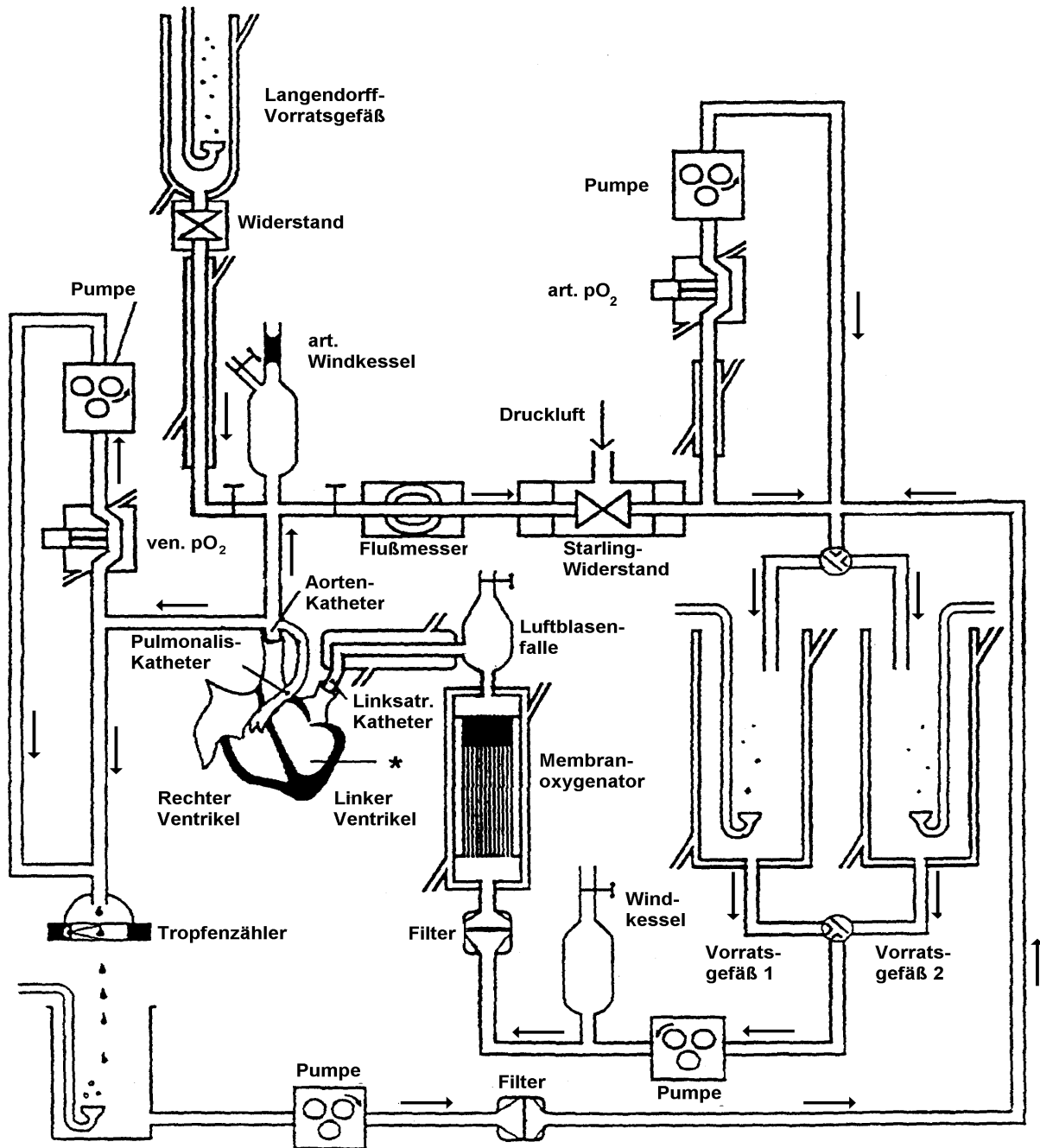


Abb. 4: Versuchsaufbau

Der Koronarfluß gelangte über die Vv. thebesii und den Sinus conorarius in den rechten Ventrikel, von wo das Perfusat in die Arteria pulmonalis ausgeworfen wurde. Von dort gelangte es über eine Tropfenzählkammer (Erfassung des koronarvenösen Flußvolumens) zunächst in einen Meßbecher. Von diesem wurde das Perfusat mit Hilfe einer Quetschrollpumpe über einen Filter in das Hauptreservoir zurückgeführt.

Chemikalien

Methoxamin und Prazosin von Sigma-Aldrich-Chemie, Germany.

Perfusionsmedium

Zunächst wurde aus verschiedenen Stammlösungen 10l Lösung folgender Zusammensetzung erstellt:

118.4 mmol/l Natriumchlorid NaCl

4.75 mmol/l Kaliumchlorid KCl

1.2 mmol/l Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4

1.2 mmol/l Magnesiumsulfat MgSO_4 .

2.5 mmol/l Kalziumchlorid CaCl_2 (Gruppen 2-8, s.u.) bzw. 1.25 mmol/l CaCl_2 (Gruppe 1, s.u.)

Die Lösung wurde für ca. 10 min. mit Kohlendioxid äquilibriert um die Bildung von Kalziumkomplexen zu verhindern. Danach wurde die Lösung mittels eines Hochdruckfilters gefiltert und schließlich in einzelne 0,5 l Glasgefäße gefüllt und verschlossen und lichtgeschützt maximal vier Wochen aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurden der Lösung noch 25 mmol Natriumhydrogenphosphat NaHCO_3 sowie 10 mmol/l Glukose und 2.0 mmol/l Pyruvat als Nährsubstrate beigemischt.

Die fertige modifizierte Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Pufferlösung (KHL) wurde sodann in die drei Vorratsgefäße der Versuchsanlage gefüllt (Langendorffgefäß, Hauptgefäß, Koronarflußbecher) wobei in jedem dieser Gefäße die Lösung mit 95% O_2 und 5% CO_2 äquilibriert wurde um die Sauerstoffversorgung zu sichern und eine Präzipitation zu verhindern.

Die Temperatur wurde mit Hilfe einer Wärmeaustauschanlage eingestellt und während des Versuches entweder bei 37.0 °C oder 31.0 °C konstant gehalten. Während eines Versuches zirkulierten 500ml Lösung im gesamten System.

Präparation

Als Versuchstiere dienten 43 Sprague-Dawley-Ratten und 6 Meerschweinchen.

Das Versuchstier wurde zunächst mit Urethan (Urethan 99% (N), Aldrich – Chemie, Germany) in 25%iger Lösung intraperitoneal (bei Ratten 0.43 ml / 100g Körpergewicht, bei Meerschweinchen 0.77ml / 100g Körpergewicht) narkotisiert, wenige besonders lebhaftere Tiere wurden vor der Injektion mit Äther betäubt. Nach ca. 15 min war meist eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, wobei das Tier auf Schmerzreize nicht mehr reagierte. Andernfalls wurde Urethan nachgespritzt. Das Tier wurde auf einem kleinem OP-Tisch befestigt und die Haare über Brustkorb und Hals abrasiert. Nach nochmaliger Kontrolle wurde bei ausreichender Narkosetiefe zunächst mit einem Skalpell die Haut und Muskulatur am Hals durchtrennt, die Trachea aufgesucht, aufgeschnitten und mit einem Katheter an ein Beatmungsgerät angeschlossen, so dass während der Operation eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Tieres gewährleistet war.

Nun wurde die A.carotis dextra aufgesucht und mit einem Zugang versehen, dieser diente dazu während der Operation Blutverluste auszugleichen (mit KHL-Lösung, Zusammensetzung s.o.). Dann wurde der Brustkorb entlang des Brustbeines aufgeschnitten und mit einer arretierbaren Zange aufgespreizt. Das Herz wurde vom Perikard befreit. Sodann wurde die untere Hohlvene aufgesucht und mit einem Markierungsfaden versehen, ebenso die obere Hohlvene und die Aorta. Das Herz war nun bereit zur Entnahme. Zuvor wurde über den Karotiszugang 25 IE Heparin gespritzt um eine Thrombosierung der Koronargefäße auszuschließen. Daraufhin wurden die obere Hohlvene mit den bereitliegenden Fäden zugebunden und dann das Herz mitsamt Lunge und Mediastinum herausgeschnitten und sofort in ein vorher bereitgestelltes Gefäß mit Eiswasser getaucht, wodurch ein sofortiger Herzstillstand ausgelöst wurde.

Im Eisbad wurden vorsichtig die Lungen vom Herz abgetrennt und dann das Herz mit der durch den Markierungsfaden leicht auffindbaren Aorta an der Aortenkanüle der Versuchsanlage befestigt. Dabei betrug die Zeit von der Explantation bis zur Befestigung an der Versuchsanlage höchstens drei Minuten.

Das an der Anlage befestigte Herz wurde nun zunächst retrograd über die Aorta aus dem Langendorffgefäß perfundiert und begann mit Perfusionsbeginn wieder sich zu kontrahieren. Als nächstes wurde das Herz von Oesophagus und Trachea sowie restlichen Gewebe befreit. Dann wurde die A. pulmonalis mit dem Pulmonalkatheter verbunden. Nun wurde in den

linken Vorhof der Katheter des zuführenden Schenkels des Hauptkreislaufs eingeführt und befestigt und dann die Perfusion vom Langendorff- auf den eigentlichen Versuchskreislauf umgestellt. Das Perfusat floß nun aus dem Hauptreservoir über den linken Vorhof in den linken Ventrikel und von dort zurück in das Hauptreservoir. Das die Koronarien durchströmende Perfusat gelangte in den rechten Ventrikel und wurde von dort in die A. pulmonalis ausgeworfen und ebenfalls in das Hauptreservoir zurückgeführt.

Zum Schluß wurde eine Stahlkanüle in den linken Ventrikel eingestochen. Die Stahlkanüle war mit einem Plastikdom verbunden, in dem sich der Meßfühler eines Katheter-Tip-Manometers (Millar 5 F) zur Messung des intraventrikulären Druckes befand. Dieses Katheter-Tip-Manometer war so aufgehängt, daß es federnd allen Pumpbewegungen des Herzens annähernd widerstandslos folgte.

Meßwerte

Aortendruck: Der Aortendruck wurde durch einen Starlingwiderstand reguliert, der sich mit Hilfe eines Quecksilbermanometers nach Gauer steuern ließ. Der Meßpunkt lag am Boden des Windkessels direkt hinter der Aortenkanüle. Gemessen wurde mit einem Statham-Druckwandler P23DB, dessen Signale von einem BMT-Gleichspannungsverstärker verstärkt wurden.

Druck im linken Vorhof: Unmittelbar vor der Vorhofkanüle lag der Meßpunkt für den Druck im linken Atrium, ebenfalls registriert durch einen Statham-Druckwandler P23DB.

Linksventrikulärer Druck: Dieser wurde über ein Katheter-Tip-Manometer Millar 5F gemessen, dessen Meßkopf sich in einer kleinen Plexiglasskuppel befand. Diese wurde mit Hilfe einer Stahlnadel in den Ventrikel gestochen. Die Signale wurden über einen BMT-Linearverstärker zum Schreiber geleitet, wo aus der Originalregistrierung der enddiastolische Druck EDP abgelesen wurde.

Druckänderungsgeschwindigkeit im linken Ventrikel ($LVdP/dt_{max}$ und $LVdP/dt_{min}$): Mit einem BMT-Differenzierungsverstärker wurde aus dem vom TIP-Katheter-Manometer aufgenommenen Signal der erste Differentialquotient über der Zeit gebildet bei einer

Aufzeichnungsgrenzfrequenz von 80 Hz und einer Verzögerung von 2ms. Die maximalen Druckänderungsgeschwindigkeiten wurden aus der Originalregistrierung abgelesen.

Aortenfluß: Dieser wurde durch ein dem Herzen nachgeschaltetes elektromagnetisches Flowmeter (Statham SP 2202) gemessen und aufgezeichnet. Die Grenzfrequenz der Registrierung lag bei 100 Hz.

Koronarfluß: Das Volumen des Koronarflusses wurde mit einem Tropfenzähler nach KÜHNBERG bestimmt. Das Perfusat tropfte dabei frei aus einem Filter durch eine Lichtschranke, die die Tropfenzahl pro Zeiteinheit ermittelte. Diese wurden in analoge Flußwerte (ml / min) umgerechnet und fortlaufend registriert.

Herzfrequenz: Getriggert mit dem phasischen Ventrikeldruck wurde die Herzfrequenz durch ein in der institutseigenen Elektronikwerkstatt entwickeltes und gebautes Herzratenmeter gemessen.

Temperatur: Mit Hilfe eines Thermostaten wurde die Temperatur des Perfusats eingestellt und konstant gehalten. Mittels eines Meßfühlers am Boden des Windkessels oberhalb der Aortenkanüle mit einer Empfindlichkeit von 0.1 °C erfolgte eine kontinuierliche Kontrolle.

Zeitkonstante tau (t): tau wurde durch Lösen der Formel für den isovolumetrischen Druckabfall mittels dreier Parameter (p(t), p₀, p_∞) berechnet:

$$p(t) = p_{\infty} + (p_0 - p_{\infty}) \left(-\frac{t}{\tau} \right); \quad t = \text{Zeit} / p = \text{Druck}$$

Folgende Größen wurden aus den Meßwerten berechnet:

-Mittlerer arterieller Druck:

$$PM = \frac{PD + (PS - PD)}{3}$$

PM=mittlerer arterieller Druck

PD=diastolischer Druck (hPa)

PS=systolischer Druck (hPa)

-Herzzeitvolumen (HZV) = Aortenfluß+Koronarfluß

-Schlagvolumen (SV) = Herzzeitvolumen/Herzfrequenz

-Sauerstoffverbrauch

$$VO_2 = \frac{a * F_{cor} * (pO_{2art} - pO_{2ven})}{LD}$$

VO_2 = Sauerstoffverbrauch (ml/min)

a =Bunsenscher Löslichkeitskoeffizient = 0.024ml Gas (O₂) / ml Lösungsmittel bei 37°C

F_{cor} = Koronarfluß (ml/min)

pO_{2art} =arterieller O₂-Partialdruck

pO_{2ven} =venöser O₂-Partialdruck

LD=aktueller Luftdruck

-Wirkungsgrad: $EF = \frac{\text{abgegebene Energie}}{\text{aufgenommene Energie}} * 100\%$

abgegebene Energie = äußere Herzarbeit

aufgenommene Energie = Sauerstoffverbrauch* kalorisches Wärmeäquivalent (wobei gilt: kal. Wärmeäquivalent= 21.1 kJ/l O₂ für reine Kohlenhydratverbrennung).

Registrierung

Der phasische Aortendruck, der phasische Ventrikeldruck, die Druckänderungsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, der Aortenfluß, der Koronarfluß, die Herzfrequenz und der koronarvenöse Sauerstoffpartialdruck wurden fortlaufend auf einem Acht-Kanal-Kammschreiber (Uniscrpt UD 210, Firma Schwarzer) registriert. Parallel dazu wurden der phasische Aortendruck, der phasische Ventrikeldruck, der enddiastolische Ventrikeldruck, die maximale und minimale Druckänderungsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, der Aortenfluß, der Koronarfluß, die Herzfrequenz sowie die Temperatur von einem 486er MS-DOS PC aufgenommen und mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe Schmidt von Dr. med. Langer entwickelten Software (EDVHerz) ausgewertet. Der Computer diente dabei vor allem zur Berechnung der t- Werte.

Die übrigen Meßwerte wurden unter steady-state Bedingungen von den entsprechenden Meßgeräten abgelesen und dokumentiert.

Abb. V zeigt eine Originalregistrierung.

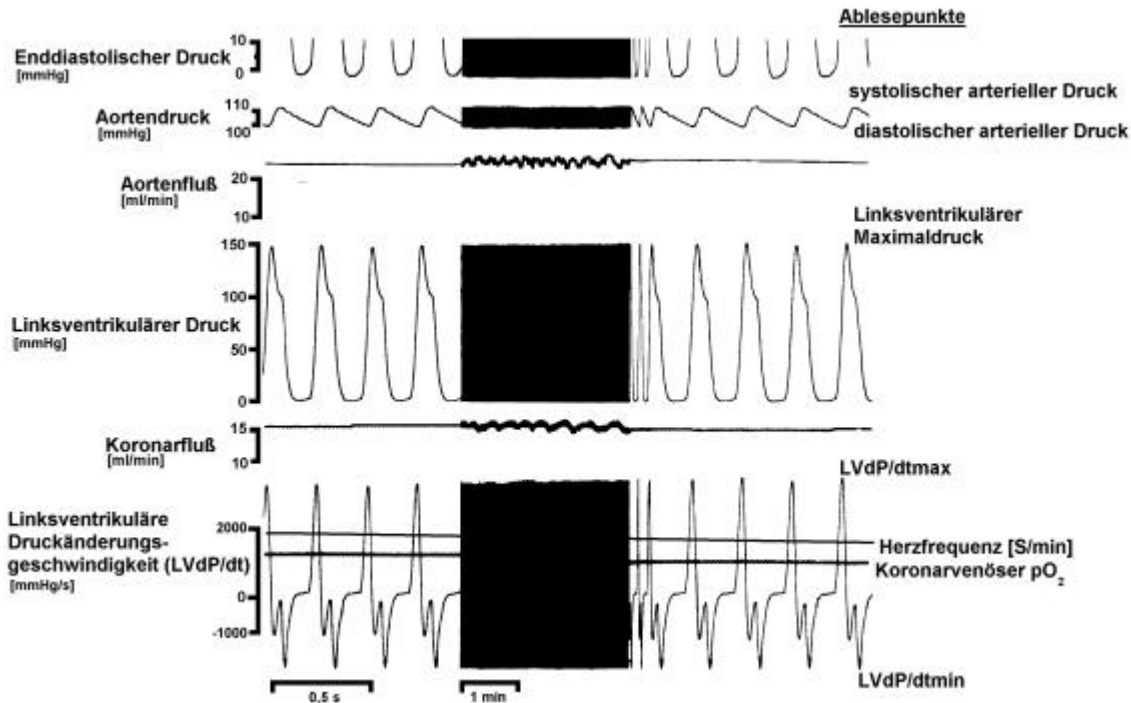


Abb. 5: Schema einer Originalregistrierung des 8-Kanalschreibers

Kalibration

Vor jedem Versuch wurden alle Meß- und Registrierungsapparaturen geeicht und die Eichung auf dem Achtkanalschreiber protokolliert. Die verschiedenen Druckabnehmer sowie das Katheter-TIP-Manometer wurden mit einem Quecksilbermanometer nach Gauer geeicht. Die Eichung der Flüsse erfolgte mit Meßzylinder und Stoppuhr. Die Clarkelektroden für die Sauerstoffpartialdrücke wurden mit drei verschiedene Eichlösungen (0%, 21% und 95% O₂-Konzentration) geeicht.

Versuchsdurchführung

Vor Versuchsbeginn wurde jedes Herz auf seinen kontraktilen Status überprüft. Dazu wurden die Herzen bei konstanter Nachlast einer steigenden Vorlast ausgesetzt durch Erhöhung der Pumpendrehzahl der Hauptpumpe. So wurde getestet, inwieweit das Herz die steigende Volumenbelastung im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus mit einer Steigerung der Kontraktionskraft beantwortet. War die Belastungsgrenze erreicht, d.h. eine weitere Vorlasterhöhung durch Erhöhung der Pumpendrehzahl führte zu keinem Anstieg der Druckanstiegsgeschwindigkeit mehr, wurde der Belastungstest beendet.

Die Versuche sind in 8 Gruppen einzuteilen, wobei bis auf Gruppe 7 alle Versuche an Rattenherzen durchgeführt wurden:

- *Gruppe 1: 6 Versuche bei 1,25 mmol/l Ca^{2+}
- *Gruppe 2: 6 Versuche bei 2,5 mmol/l Ca^{2+}
- *Gruppe 3: 6 Versuche bei 8,75 mmol/l Ca^{2+}
- *Gruppe 4: 6 Versuche bei 10 mmol/l Ca^{2+}
- *Gruppe 5: 6 Versuche bei 2,5 mmol/l Ca^{2+} bei 31°C
- *Gruppe 6: 3 Versuche nach Prazosin
- *Gruppe 7: 4 Versuche mit Meerschweinchenherzen
- *Gruppe 8: Versuch mit hoher Einzeldosis

Bei jedem Versuch der Gruppe 1-7 wurde Methoxamin in 14 Schritten in kumulativer Dosis verabreicht (von $2,0 \cdot 10^{-8}$ mol/l = 1. Dosis bis $1,7 \cdot 10^{-4}$ mol/l = 14. Dosis).

In den Versuchsgruppen 1 - 4 wurde die Wirkung steigender Methoxamin-konzentrationen bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen im Perfusat.

Um jeweils die gewünschte Kalziumkonzentration im Perfusat zu erzielen, wurde in Versuchsgruppe 1 nach Ermittlung der Starlingkurve von 2,5 auf 1,25 mmol/l kalziumhaltige KHL-Lösung umgeschaltet. Um bei den Versuchsgruppen 3 u. 4 mit 8,75 bzw. 10 mmol/l Ca^{2+} ein Ausfällen des Kalziums zu verhindern, wurde nach der Starlingreihe auf 12,5 mmol/l NaHCO_3 -haltige KHL-Lösung umgeschaltet. Danach wurde die Kalziumkonzentration des Perfusats um jeweils 1,25 mmol/l Ca^{2+} schrittweise erhöht, bis die gewünschte Konzentration erreicht war.

Während in den Versuchsgruppen 1 - 4 sowie 6 + 7 die Temperatur im Perfusat bei 37 °C +/- 0.1 °C gehalten wurde, betrug sie in Versuchsgruppe 5 31 °C +/- 0.1 °C.

Das Abkühlen dauerte ca. 30 min und geschah durch Herunterregeln der Temperatur des Wärmeaustauschsystems.

In Versuchsgruppe 6 wurden drei Versuche unternommen, wobei vor der Methoxamingabe insgesamt 2,4 mg Prazosin in steigender Konzentration verabreicht wurden.

Versuchsgruppe 7 umfaßt vier Versuche an Meerschweinchenherzen bei 37°C und 2,5 mmol/l Ca^{2+} . Der Aortendruck bei den Meerschweinchenherzen wurde konstant bei 80 hPa gehalten.

Außerdem wurde ein Versuch durchgeführt mit einer hohen Einzeldosis Methoxamin (Versuchsgruppe 8). Diese Dosis wurde aus den zuvor erstellten Dosis-Wirkungskurven ermittelt und betrug $2.1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, einer Dosis, bei der Methoxamin bei Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven eine submaximale Wirkung zeigte. Nach einer Auswaschphase wurde die gleiche Dosis nochmal appliziert, welche erneut ausgewaschen wurde bevor das 3. mal eine Bolusgabe erfolgte. Vor der 2. Dosis wurde die Kalziumkonzentration von 2,5 mmol/l auf 1,25 mmol/l Ca^{2+} erniedrigt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte rechnergestützt mit den Programmen LOTUS 1-2-3 und SIMSTAT 3.5b (Provis Research, Montreal). Dabei kamen folgende Formeln zur Anwendung:

Arithmetisches Mittel:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n=Versuchszahl
 x_i =Einzelwerte

Standardabweichung des arithmetischen Mittels:
$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i - \bar{x}}$$

n=Versuchszahl

Bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse diente der Mittelwert der Standardabweichung (Standard error of the mean = SEM) als Fehlerabweichung. Der SEM wurde nach folgender Formel berechnet:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n=Anzahl der Werte

s=Standardabweichung

Zur Beurteilung ob sich die Meßwerte signifikant vom Kontrollwert unterscheiden wurde der Student-t-Test für verbundene Stichproben angewandt, wobei signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ angenommen wurden, bei $p < 0.01$ galten die Unterschiede als hochsignifikant. Der Test wurde zweiseitig ausgeführt, da sich die Werte in beide Richtungen (Anstieg- Abfall) ändern konnten.