

## **IV. MATERIAL UND METHODEN**

### **IV.1 Die normotherme Hämoperfusion der isolierten Herzen**

#### **IV.1.1 Der Perfusionskreislauf**

Für die vorliegende Arbeit kam ein ex-vivo Perfusionsmodell, welches von der Firma Mediport speziell zur Perfusion isolierter Herzen entwickelt wurde, zum Einsatz. Bei diesem Aufbau ermöglichen drei getrennte Kreisläufe die koronare Perfusion mit einer Mischung aus zitrantikoaguliertem Eigenblut des Tieres und Perfusionslösung im Verhältnis 1:1. Die Apparatur basiert auf den Prinzipien der normothermen Hämoperfusion isolierter Säugetierorgane nach von Baeyer et al. (1997).

Als zentraler Kreislauf führt der Perfusatkreislauf das oxygenierte Blut-Perfusionsgemisch dem Herz retrograd über die Aorta zu. Nach Passage der Herzgefäße sammelt sich das Blutmedium im Perfusionsreservoir, welches auf einer Waage steht. Diese ist durch eine zentrale Steuereinheit mit der ersten Rollerpumpe elektronisch verbunden.

Die erste Pumpe ist über eine Schlauchverbindung dem Reservoir direkt nachgeschaltet und sorgt somit für den Abtransport des passiv aus dem Herzen ablaufenden Blutgemisches. Dadurch wird das Blut in das danach folgende Dialysem modul gepresst. Diese Schlauchverbindung zum Dialysem modul wird als venöser Schenkel der Apparatur bezeichnet. Über das „low flux“ Polysulfon-Dialysem modul (Modul F6, Fresenius AG, 61343 Bad Homburg) steht der Perfusionskreislauf mit dem Dialysatkreislauf in direkter Verbindung. Die zweite Pumpe folgt nach dem Modul und befördert das Blut über eine Luftfalle wieder direkt zur Aorta des an einem Plastikschwenkarm befestigten Herzens. Der, der zweiten Pumpe nachgeschaltete Teil, stellt somit den arteriellen Schenkel der Apparatur dar. Durch die dem arteriellen Schenkel zwischengeschaltete Blasenfalle wird eine blasenfreie Perfusion des Herzens garantiert. Eine ständige Mengenkontrolle des Perfusionsgemisches und die direkte Verbindung der Waage mit den beiden Rollerpumpen ermöglichen eine automatische Konstanz der Nettoflüssigkeitsmenge im Perfusatkreislauf, indem sie bei Abweichungen vom vorgegebenen Gewichtswert des Perfusionsgemisches die Drehzahl der ersten Rollerpumpe verändern. So können Flüssigkeitsverschiebungen über des Dialysem modul verhindert werden.

### **IV.1.2 Der Dialysatkreislauf**

Das zentrale Element in diesem Kreislauf ist der bereits oben erwähnte Dialysatfilter, ein Hohlfasermodule für die Standard-Hämodialyse (High-Flux Polysulphon Kapillardialysator der Hemoflow F-Serie, Modul F6, Fresenius AG, 61343 Bad Homburg). Durch diesen wird mittels einer Pumpe das Dialysat im Gegenstromprinzip zum Blut-Perfusionsgemisch geleitet, wodurch es zum Austausch niedermolekularer Solute und zur Oxygenierung des Blut-Perfusionsgemisches kommt.

Das Dialysat, eine physiologische Elektrolytlösung, die auf ca. 38°C thermostatisiert ist, wird dann über ein Schlauchsystem einem ca. 10 l fassendem Plexyglaszylinder als Reservoir zugeführt. In der Bodenplatte dieses Zylinders befinden sich zwei Ventile, deren eines zum permanenten Einleiten von Sauerstoff und das andere für die Zugabe von Kohlendioxid bei Bedarf zur Konstanthaltung des Dialysat- und damit auch des Blut-pH Verwendung findet. Die Dialyseflüssigkeit wird aus dem Dialysereservoir durch eine Kreiselpumpe (Heidolph Typ 523.031.00010B, Heidolph Elektro GmbH & Co.KG, 93309 Kehlheim) mit einer Flussrate von 5 l/min durch das Dialysemodule gefördert und gelangt dann wieder in das Dialysereservoir zurück.

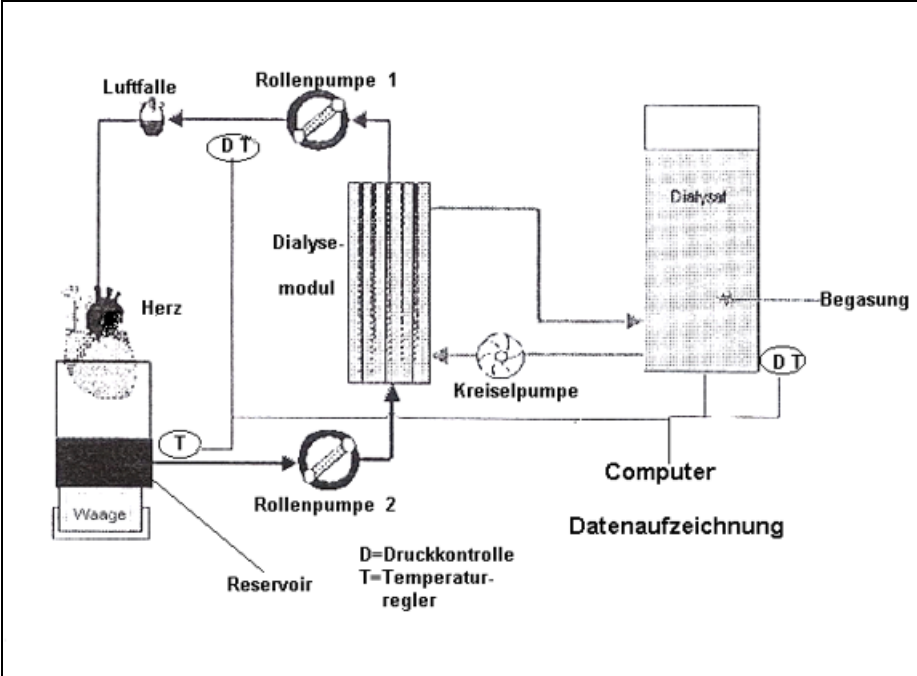
Für die Perfusion aller Herzen wurde die gleiche Dialysat-Rezeptur verwandt und das Dialysat mit D-Glucose als energielieferndes Substrat ergänzt. Die Pufferung geschah über das Bikarbonat-Kohlensäure-System.

### **IV.1.3 Der Wärmekreislauf**

Der Wärmekreislauf dient der Aufrechterhaltung einer für die Herzarbeit unabdingbaren physiologischen Temperatur von ca. 38°C. Als Reservoir für die Wärmeflüssigkeit (es wurde Aqua dest. verwandt) benutzen wir ein 10 l Flüssigkeit fassendes Plastikbecken, in dem sich das Wärmemodule mit integrierter Pumpe befand (Haake C1, Fa. Haake, 76227 Karlsruhe). Von diesem zweigt ein Schlauchsystem zu einem doppelwandigem Gefäß, das Blutreservoir des Perfusionskreislaufs und erwärmt somit das Blut und durch Konvektion auch das Herz. Aus diesem Gefäß wird die Wärmeflüssigkeit über weitere Schläuche durch ein Metallrohr und dann zurück zum Reservoir geleitet. Das Metallrohr befindet sich in

dem Plexyglasbehälter des Dialysates, welches dadurch ebenfalls erwärmt wird. Eine Temperaturmessung findet über einen Temperaturfühler im arteriellen Schenkel, im Blutreservoir, sowie im Dialysatreservoir kontinuierlich statt.

Abbildung 6: Schema des Perfusionsaufbaus zur Perfusion isolierter Herzen



## **IV.2 Lösungen der Versuchsserie**

Sowohl die BDM-Kardioplegielösung, als auch das Dialysat bestanden aus einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung. Diese Lösung wird nach Döring (1996) bei der Perfusion isolierter Säugetierherzen am häufigsten verwendet, wobei sie als alleiniges Perfusat oder zusammen mit anderen Bestandteilen verwendet wird (Modersohn et al. 1997; Tian et al. 1995; Powell und Wapnir 1995).

### **IV.2.1 Dialysat**

Als Dialysat wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Das Dialysat wurde zum einen zur Hämodilution des autologen Blutes für die Herzperfusion, zum anderen zur Befüllung des Dialysatkreislaufes verwendet. Zur genauen Zusammensetzung des Dialysates siehe Tabelle 3.

Dem Dialysat wurden noch Glucose und Insulin zugesetzt. Damit sollte der Kohlenhydratstoffwechsel als effektivster Weg während der kalten Ischämiezeit gefördert werden. Nach Sultan und Khan (1997) kommt es durch die Insulingabe zu einem vermehrten Glucoseverbrauch.

### **IV.2.2 Kardioplegielösungen**

Für den ersten Teilversuch mit 15 Herzen wurde als Kardioplegielösung eine Krebs-Henseleit-Lösung unter Zusatz von Glucose, Insulin und 2,3-Butanedione Monoxime (BDM) verwendet. Diese Lösung wird nach Stringham et al. (1992) als geeignet auch für Langzeitversuche mit isolierten Herzen angesehen.

Für die weiteren 15 Herzen wurde eine gebrauchsfertige Custodiol®-Lösung eingesetzt. Auch diese Kardioplegielösung ist für eine Langzeitkardioplegie geeignet. Zur genauen Zusammensetzung beider Lösungen siehe Tabelle 3 und Tabelle 2 III.5.2.6.

Sowohl das Dialysat als auch die selbst hergestellte Kardioplegielösung wurden jeweils frisch einige Stunden vor dem Versuch angesetzt. Letztere wurde kurz vor der Herzentnahme noch mit medizinischem Sauerstoff für eine Zeit von 15 Minuten begast und danach auf Eis in einem Kühlschrank bei 4° kühl gehalten.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Dialysat- und BDM-Kardioplegielösung nach Modersohn et al. (Modersohn et al.1997)

Substanz	Konzentration	Bezugsnachweis
NaCl	128 mmol/l	Sodium chloride,Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol/l	Sodium hydrogencarbonat,U-LAB-A,Falkensee
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 mmol/l	di-Potassium hydrogen phosphate, RdH Laborchemikalien, Seelze
KCl	3,6 mmol/l	Potassium chloride RdH Laborchemikalien, Seelze
MgSO <sub>4</sub>	0,76mmol/l	Magnesium sulfate heptahydrate, Merck,Darmstadt
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mmol/l	Calcium chloride dihydrat,Merck, Darmstadt
Insulin	10 I.E./l	Insuman®Rapid, 40 I.E./ml, Hoechst Marion Roussel, 65926 Frankfurt
Heparin	2000I.E/l	Liquemin®N 25.000, Hoffmann-La Roche
Glucose	11,2 mmol/l	D(+)-Glucose, Merck,Darmstadt
Zusätzlich für die Kardioplegielösung:		
BDM	30 mmol/l	2,3-Butanedione monoxime, Sigma, St. Louis, USA

## **IV.3 Die Organgewinnung der isolierten Herzen**

### **IV.3.1 Auswahl der Tiere für die Organgewinnung**

Die Schafe (Anzahl n = 15) gehörten ausnahmslos der Merino-Schafrasse an und wurden als Versuchstiere im Forschungshaus der Charite gehalten. Alle Tiere waren 1 bis 1½ Jahre alt und hatten zum Zeitpunkt der Versuchsserie ein Lebendgewicht von 30 bis 35 kg. Diese Tiere wurden direkt vor Versuchsbeginn auf ihren Gesundheitszustand hin klinisch untersucht. In diese Beurteilung flossen die Bewertung der Körperhaltung der Tiere (nicht sitzend oder liegend, alle vier Gliedmassen gleichmäßig belastend), der Körpertemperatur, der Atmung und der Schleimhautfarbe, sowie das Nichtvorliegen sonstiger Krankheitsanzeichen ein.

### **IV.3.2 Spezielle Vorbereitungen für die Herzentnahme**

Um die warme und kalte Ischämiezeit und damit die Schäden am Myokard des Herzens nach der Entnahme möglichst gering zu halten, wurden vor der Entnahme sowohl chirurgisches Besteck in Form von Skalpell, Scheren, chirurgischen Pinzetten und Klemmen als auch Tupfer, Bauchtücher und Desinfektionsmittel, sowie eine Spritze mit Heparin (10.000 I.E; Liquemin®N 25000, Hoffmann-LaRoche AG, 79639 Grenzach-Whylen) zur präoperativen Antikoagulation vorbereitet. Zur Thorakotomie wurden als spezielles Besteck ein Hammer und Meißel, sowie ein Thoraxspreizer steril vorbereitet.

Für die Aufnahme des präoperativ gewonnenen Blutes wurden Blutkonservierungsbeutel (Compoflux, Hersteller: NPBI Emmer-Compascuum, NL) mit einer Kanüle zur Venenpunktion verwendet. Das Herzgewicht wird mit einer bereitgestellten Digitalwaage (Sartorius PT6, Sartorius AG, 37075 Göttingen) bestimmt. Zur Herzkardioplegie wird ein großer Infusionsständer benutzt, der ein für die Koronarperfusion ausreichendes Gefälle gewährleistet.

Die auf 4°C gekühlte Kardioplegielösung wurde über Koronarkatheter in die Koronarostien instilliert.

Ebenso muss eine Oxygenierung und Heparinisierung, sowie eine Antibiose, z. B. mit Cefazolin (Cephazolin Fresenius1g®; Fresenius-Kabi Deutschland GmbH, 61352 Bad Homburg v.d.H.) v.a. bei Langzeitversuchen, der Lösung stattgefunden haben.

### **IV.3.3 Die Herzentnahme im Tieroperationssaal**

Ein zentrales Anliegen auch im Sinne des Tierschutzes war es, den Tieren im Vorfeld der Operation möglichst wenig Stress zuzumuten. So wurde nach Möglichkeit schon im Stall der Tiere eine für die Anästhesie nötige Venenverweilkanüle (BD Adsysteme Pro®, Becton Dickinson S.A. Madrid) durch Punktion der Vena cephalica antebrachii an einer der beiden Vorderextremitäten gelegt.

Für die Anästhesie wurde Thiopental (Trapanal®; Byk Gulden Lomborg Chem. Fabrik GmbH, 78467 Konstanz) in einer Dosis von 15 mg/kg KGW intravenös über die Verweilkanüle verabreicht und das jeweilige Tier nach Scheren der linken Halsseite im Bereich der Drosselrinne und des Thorax über den gesamten Brustbeinbereich in den Tieroperationssaal gefahren.

Hier wurde das Tier in Rückenlage, an allen vier Gliedmaßen ausgebunden, auf dem OP-Tisch fixiert. Es erfolgten dann die endotracheale Intubation und Ankoppelung an das Inhalationsnarkosegerät. Als volatiles Anästhetikum wurde Isofluran® (Baxter Deutschland GmbH, 85716 Unterschleissheim) benutzt. Zur Relaxierung der Muskulatur wurde Pancuronium(Pancuronium`Organon`®, Organon GmbH, 85764 Oberschleissheim) gegeben.

Vor der eigentlichen Thorakotomie erfolgte eine Venae sectio der Vena jugularis am oberen Halsdrittel mit anschließender Punktion der Vene und langsamem Entnehmen von circa einem halben Liter Blut über einen Zeitraum von 20 Minuten. Zum Volumenausgleich und zur Verminderung von stressinduzierter Katecholaminausschüttung wurde über den venösen Zugang eine Vollelektrolytlösung(Ringer-Lactat-Infusionslösung, B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) entsprechend der Blutentnahmemenge gegeben. Über den gleichen Zugang erfolgte auch die Heparinisierung des Schafes mit 10.000 I.E. Heparin als Bolus-Injektion.

Die Thorakotomie wurde mit Hammer und Meißel direkt entlang des Brustbeins durchgeführt und der Brustkorb anschließend mit einem Thoraxspreizer offen

gehalten. Um die warme Ischämiezeit möglichst kurz zu halten, wurde auf eine herznahe Ligatur der vorderen und hinteren Hohlvene vor der Herzentnahme verzichtet. Der Herzbeutel wurde an einer Stelle mit einer chirurgischen Pinzette fixiert mit einem Skalpell eröffnet und anschließend stumpf vom Herz getrennt. Das Herz wurde mit einer Hand erfasst und leicht angehoben, um es mit einem einzigen Schnitt in toto von den Gefäßen zu trennen und herausnehmen zu können. Das noch schlagende Herz wurde sofort steril in die vorbereitete Kardioplegielösung auf Eis gelegt und manuell mehrmals durch Pumpbewegungen vom Blut getrennt. Danach erfolgte die anterograde Kardioplegie mittels Perfusion mit Kardioplegielösung. Dabei wurde ein Absaugkatheter über die Aorta direkt in die Koronarostien eingeführt. Um eine Luftinsufflation in die Koronarien zu vermeiden, wurde streng darauf geachtet, den Aortenstumpf nicht über den Flüssigkeitsspiegel der Lösung zu heben, also die Koronarperfusion unter Wasser vorzunehmen. Beide Koronarien wurden mit einem Perfusionsdruck von 150 cm Wassersäule und mit 250 ml Lösung durchspült, wobei am linken Herzkranzgefäß darauf geachtet wurde, dass sowohl der Ramus interventricularis anterior, als auch der Ramus circumflexus perfundiert wurden. Nach dieser Konservierungsbehandlung wurde das in der Lösung belassene Herz von äußerlich anhaftendem Fett und anderem Gewebe grob befreit und danach mit einer Digitalwaage gewogen. Bei einer längeren Kardioplegiezeit wurde das Herz in der Kardioplegielösung auf Eis in einem Kühlschrank aufbewahrt. Über den zeitlichen Ablauf der Herzentnahme und anschließenden Kardioplegie wurde ein Protokoll geführt.

#### **IV.4 Die Präparation des isolierten Herzens**

##### **IV.4.1 Allgemeine Vorbereitungen**

Wie zur Herzentnahme standen ein Tisch mit einem sterilen Tuch und für die Präparation des Herzens mehrere feine Scheren, ein Skalpell mit einer geraden und einer geballten Klinge und chirurgische Pinzetten bereit. Sterile Handschuhe und Tupfer, sowie die mit je einem Ballonkatheter versehenen Tip-Manometer und die Herzschrittmacher-Sonde wurden ebenfalls vorbereitet.



Um Myokardschäden durch kurzzeitiges Erwärmen zu vermeiden, wurde versucht, das Herz bei allen Manipulationen nach Möglichkeit in der Kardioplegielösung zu belassen. Zunächst wurden vorsichtig mittels Schere und Pinzette die noch anhaftenden herzfremden Gewebe abgetrennt und danach das Herz manuell in der Lösung ausmassiert. Wir wechselten dann die Kardioplegielösung, um eine Verstopfung der Blutkreislauffilter zu verhindern.

Anschließend wurde die Aorta stumpf freipräpariert und mit einer Schere auf eine Länge von ca. 5 cm gekürzt.

#### **IV.4.2 Positionierung der Ballonkatheter sowie der Herzschrittmachersonde**

Nach der Präparation des Herzens folgte die Positionierung der Ballonkatheter und das Einführen der Herzschrittmacher-Sonde. Zur Herstellung der Ballonkatheter wurde über dem Messpunkt des Tip-Manometers ein dehnbarer Latexballon festgebunden. Dieser musste im gefüllten Zustand das Ventrikellumen möglichst optimal ausfüllen und das Myokard vordehnen können. Nach einer Dichtigkeitsprobe wurde ein Katheter im nichtgefüllten Zustand über die Pulmonalvene in den rechten Ventrikel und der andere Katheter über die Aorta ebenfalls unter Schonung der Klappen, die eine Regurgitation des Blutes aus der Aorta in die Kammern während der Perfusion verhindern sollten, in den linken Ventrikel geschoben.

Beide Katheter wurden dann mittels eines Fadens ( Prolene 3/0 ) schonend am Herz befestigt, um ein mechanisches Herausdrücken während der Herzkontraktionen zu vermeiden.

Um eine möglichst physiologische Erregungsausbreitung zu simulieren, wurde die Herzschrittmachersonde in den rechten Vorhof positioniert und ebenfalls durch einen Faden fixiert. Durch diese Sonde war zum einen eine gute elektrische Erregung des Myokards, zum anderen ein kontinuierliches EKG-Monitoring der Herzaktion möglich.

#### **IV.5. Vorbereitungen zur Durchführung der Perfusion**

Die Gewinnung der Herzen erfolgte in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum.

Für alle Schafherzen wurde die oben beschriebene Apparatur zur Herzperfusion benutzt, die wie folgt vorbereitet wurde:

Zu Beginn wurde der Dialysatkreislauf mit 3 Liter der oben beschriebenen Lösung (siehe Tabelle 3) befüllt und in das Dialysatreservoir eine pH-Sonde (pH-Messgerät GPH014, Fa. Greisinger, 93128 Regenstauf) zur kontinuierlichen pH-Wert-Messung gehängt. Der Dialysatkreislauf wurde dann unter Einschalten der Pumpe und Begasen des Dialysates in Betrieb genommen und anschließend weitere 600 ml des Dialysates als Perfusionslösung in das Perfusionsreservoir verbracht. Durch Einschalten der beiden Rollerpumpen des Perfusionskreislaufs wurde dieser ebenfalls gestartet und es kam zur Oxygenierung und Erwärmung beider Lösungen. Diese Phase wurde solange beibehalten, bis die Krebs-Henseleit-Lösung im Perfusionskreislauf eine Temperatur von 38° C erreicht und einen arteriellen pH-Wert von 7,3-7,4 angenommen hatte. Diese Referenzwerte wurden kontinuierlich überprüft und bei Abweichungen des pH-Wertes in den sauren Bereich Natriumhydrogenkarbonat (Natriumhydrogenkarbonat 8,4 %, Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) dazu gegeben, bzw. bei solchen in den alkalischen zusätzlich mit CO<sub>2</sub> begast.

Anschließend wurde das autologe Blut des Tieres im Verhältnis eins zu eins zum Perfusat gegeben und das Gemisch erneut kontrolliert und eventuell korrigiert. Somit wurde gewährleistet, dass der eigentliche Anschluss des Herzens an die Apparatur erst bei nahezu physiologischen Blutparametern einschließlich der Perfusionstemperatur von 38,0 bis 39,0 ° C stattfand. Die Blutzugabe erfolgte über ein Bluttransfusionssystem (Transfusionsset TN SB-3, Biotest Medizintechnik GmbH, 63775 Alzenau), um ein eventuell gebildete Gerinnsel abzufangen. Die elektronische Waage wurde dann so eingestellt, dass das Sollgewicht bei 1500 g lag. Ebenso wurde dafür gesorgt, dass der Herzschrittmacher und ein Defibrillator, sowie das Gerät zur kontinuierlichen Blutgasüberwachung (Paratrend®, TrendCare TCM 7000, Diametrics Medical Care, 2658 Patton Road Roseville, USA) einsatzfähig bereitstanden. Das mit der Krebs-Henseleit-Lösung diluierte Eigenblut zirkulierte dann ebenfalls noch eine halbe Stunde in der Apparatur, wobei es zur Oxygenierung

kam. Auch während dieser Zeit wurden kontinuierlich der pH-Wert und die Elektrolyte gemessen. Zur Gerinnungshemmung wurde initial zum frisch gewonnenen Blut Natriumcitrat, später, nach Zugabe des Blutes in den Perfusionsaufbau, Heparin gegeben. Letzteres wurde bewusst verwendet, um später ohne Koagulationsgefahr Calcium zuführen zu können.

#### **IV.6 Anschluss der Herzen an die Apparatur**

Erst zu diesem Zeitpunkt konnte der zweite Teil, nämlich der Anschluss des Herzens durchgeführt werden. Dazu wurde der „Flow“ der Rollerpumpen soweit erniedrigt, dass nur noch eine geringe Menge Blut-Perfusionsgemisch zum Herzen geleitet wurde, um eine langsame und gleichmäßige Erwärmung des Myokards zu erreichen. Dieses wird von Buckberg bei Drücken von 50 mmHg angegeben (1987). Flankiert wurde diese Maßnahme noch dadurch, dass das Herz bereits vorher für circa zehn Minuten mit der Kardioplegielösung in Raumtemperatur verbracht wurde.

Nach und nach wurde dann der Perfusionsfluss mit beginnender Herztätigkeit gesteigert, wobei ein Organfluss von  $60-120 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 100\text{g Organgewicht}^{-1}$  nach Scheunert und Trautmann (1987) und ein Perfusionsdruck von 80-120 mmHg (Scheunert und Trautmann 1987) als Referenzbereiche angegeben werden.

Um eine Verunreinigung der Perfusionslösung mit Kardioplegie zu verhindern, fand der Anschluss des Herzens so statt, dass das abfließende Blut für eine gewisse Zeit nicht in das Auffanggefäß der Versuchsapparatur gelangte und so die Kardioplegielösung ausgewaschen wurde. Unmittelbar nach der Befestigung des Herzens wurden die intraventrikulären Ballonkatheter, der Schrittmacher und die Messapparaturen angeschlossen und die Katheter gefüllt. Dieses geschah mit Perfusionslösung und nicht mit einer anderen Flüssigkeit, um bei einem eventuellen Leck der Latexballons keine Kontamination zu riskieren.

Die Herzen begannen bereits einige Minuten nach dem Anschluss, von der vorherigen Kardioplegiezeit unbeeinflusst, Kontraktionen der Vorhof- und unabhängig davon auch der Kammermuskulatur zu zeigen. Herzen, die keinen spontanen Sinusrhythmus zeigten, oder Kammerflimmern, bzw. -oszillationen aufwiesen, wurden defibrilliert. Die Defibrillationen erfolgten mit 20 bis 60 Joule und wurden bei Nichterfolg wiederholt, bis sich eine Herzarbeit mit Sinusrhythmus einstellte. Diese

Vorgehensweise wurde durch Gaben von Noradrenalin in Verdünnung (Arterenol®-Injektionslösung 1:1000 [Arterenol 1ml®, Hoechst AG, 65926 Frankfurt/Main] welche mit NaCl-Lösung 0.9% 1:100 verdünnt wurde) unterstützt. Diese Vorgehensweise ist analog zur ventrikulären Fibrillation im Rahmen der Reanimation beim Menschen (Lindner et al. 1991), obwohl hier beim isolierten Herzen eine geringere Energiemenge zur Defibrillation verwendet wird, da es eine direkte Defibrillation am Herzen ist. Bei der Reanimation des Herzens wurde Noradrenalin gegenüber Adrenalin der Vorzug gegeben, da es sich in unterschiedlichen Studien als effektiver dargestellt hat (Lindner et al. 1991; Ensinger et al. 1993; Lindner und Ahnefeld 1989).

In neueren Studien wird auch ein positiver Effekt von Vasopressin, das die Organperfusion bei der Reanimation verbessert, der dem von Adrenalin überlegen sein soll, hervorgehoben (Strohmenger et al. 1996; Lindner et al. 1997).

#### **IV.7 Reanimation der Herzen mit Hilfe eines Defibrillators**

Bei einigen Herzen, die nicht spontan ausreichend durch die Reperfusion reanimiert werden konnten, wurde in der Versuchsreihe ein Defibrillator eingesetzt (Firma Marquette Hellige, 70839 Gerlingen mit angeschlossenen Löffelektroden). Alle Herzen wurden in einem Energiebereich von 20- bis 60 Joule defibrilliert, indem die Löffelektroden direkt mit der Herzoberfläche an sich gegenüberliegenden Stellen in Verbindung gebracht wurden. Durch diese Methode kann bei isolierten Herzen nach Gray et al. (1997) eine Aktivierung der sinoatrialen Schrittmacherregion erreicht werden.

Der Defibrillator verfügte zusätzlich noch über einen integrierten Schrittmacher (Demand-Schrittmacher der Fa. Marquette Hellige, 70839 Gerlingen), der bei fehlendem Eigenrhythmus des Herzens ausschliesslich in der Vorversuchsphase eingesetzt wurde bei Herzfrequenzen unter 50 Schlägen pro Minute.

## IV.8 Regel und Messtechnik, Datenaufzeichnung

### IV.8.1 Messungen unter steady-state Bedingungen

Unter steady-state wurde bei der Versuchsserie v.a. die gleichmäßige Herztätigkeit bei konstant gehaltenen Bedingungen verstanden. Dieser Zeitpunkt wurde nach weiteren 15 Minuten nach Anschluss des Herzens an die Apparatur erreicht. Dies ließ sich damit erklären, dass das Herz über das durchströmende Blut langsam erwärmt wurde und erst ab einer bestimmten Temperatur mit konstanter Eigenfrequenz schlägt. Zur Findung einer Eigenfrequenz mussten einige Herzen für die ersten Minuten noch durch die Schrittmachersonde unterstützt werden, welches zu unterschiedlichen isovolumetrischen Maxima der Herzarbeit führte.

Aus diesen Gründen konnte die dann kontinuierliche Aufzeichnung der isovolumetrischen Maxima der Herzen erst nach dieser Übergangszeit beginnen.

Die isovolumetrischen Maxima wurden mittels einer kontinuierlichen Noradrenalingabe erzeugt, die über einen Perfusor direkt in den arteriellen Schenkel der Versuchsapparatur erfolgte.

Noradrenalin bindet am Herzen vor allem an  $\beta_1$ -Adrenozeptoren (Affinität  $\beta_1:\beta_2$  30:1). Dieses Noradrenalin wird während einer Aktivierung von sympathischen kardialen Nervenfasern physiologischerweise pinozytotisch aus präsynaptischen Varikositäten freigesetzt (Brodde 1991). Es bewirkt auf zellulärer Ebene eine Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens durch eine Aktivierung des Adenylatcyclase-Systems. Sowohl  $\beta_1$ - als auch  $\beta_2$ -Adrenozeptoren koppeln dann über ein stimulatorisches Guanin-Nukleotid-bindendes Protein an die Adenylatcyclase, die dann vermehrt cAMP aus ATP bildet, welches als intrazellulärer second messenger über eine Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen die Calciumkonzentration der Myokardzelle und somit die Kontraktionskraft erhöht (Brodde,1991)

## **IV.8.2 Versuchsprotokoll**

Protokollarisch festgehalten wurden die Herzfrequenz (HF) in Schlägen pro Minute, die links- und rechtsventrikuläre systolische (LVP und RVP) und enddiastolische (LVEDP und RVEDP) Druckerzeugung in mmHg, sowie der koronare Blutfluss (CBF) und der arterielle Druck (CPP) im Perfusionssystem.

Der Beginn der Messung erfolgte stets erst nachdem das Herz eine steady-state-Phase erreichte, also circa 15 Minuten nach Anschluss des Herzens. Die Messwerte wurden direkt online und kontinuierlich registriert. In das Versuchsprotokoll flossen sämtliche Werte, notiert in Abständen von drei Minuten über einen Versuchszeitraum von einer Stunde.

Die medikamentöse Stimulation fand bei allen Versuchen in der Vorversuchsphase durch die Zugabe von Noradrenalin mittels eines Perfusors in den arteriellen Schenkel des Systems statt.

Ferner wurden noch kontinuierlich im Abstand von 30 Minuten Blutgasanalysen des arteriellen und venösen Blutes, verbunden mit einer Oximetrie, und eine Blutgasanalyse des Dialysates durchgeführt. Das arterielle Blut wurde aus dem arteriellen Schenkel an einer definierten Entnahmestelle, das venöse Blut direkt aus dem rechten Vorhof gewonnen. Zur Dialysatentnahme wurde eine Stelle zwischen Kreiselpumpe des Dialysatkreislaufes und dem Dialysem modul gewählt.

## **IV.9 Überwachung der Blutparameter**

### **IV.9.1 Blutgasanalysen**

Gerade für Langzeitversuche war es uns wichtig, die unterschiedlichen Blutparameter, wie die Blutgase und auch die Elektrolyte über die gesamte Versuchszeit in einem physiologischen und auch konstanten Bereich zu belassen. Zur kontrollierenden Messung standen uns sowohl ein Blutgasgerät (Blutgasgerät ABL, Radiometer Copenhagen, Radiometer GmbH, 47862 Willich), sowie für den Hämoglobin- und Hämatokritwert ein photometrisches Gerät (Photometer OSM 3, Radiometer GmbH, 47862 Willich) zur Verfügung. Ebenso wurde im Dialysat und damit indirekt auch im Blut-Perfusat-Gemisch über ein pH-Meter (pH-Messgerät GPH014, Fa. Greisinger, 93128 Regenstau) kontinuierlich der pH gemessen.

Bis zur Erlangung eines steady states wurde in der Vorbereitungsphase, also vor Anschluss des Herzens an den Perfusionskreislauf, alle fünf Minuten eine Blutgasanalyse und kombiniert eine Kontrolle des Hämoglobinwertes durchgeführt und die Werte im Versuchsprotokoll notiert.

Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe wurde noch zusätzlich ein Paratrend-Gerät (Paratrend®, TrendCare TCM 7000, Diametrics Medical Care, 2658 Patton Road Roseville, USA) eingesetzt, welches eine direkte online-Aufzeichnung der Blutgasanalysen ermöglichte.

#### **IV.10.2 Elektrolytbestimmungen**

Wie weiter oben bereits erwähnt ist auch die Konstanthaltung der Elektrolyte während eines Versuches und auch, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Versuche untereinander zu gewährleisten, in der gesamten Versuchsserie einzuhalten. Im Zentrum der Überwachung standen neben den Natriumkonzentrationen v.a. die Kalium- und Kalziumwerte des Blut-Perfusatgemisches, da diese die diastolische Depolarisation bzw. die Inotropie des Herzens direkt beeinflussen.

Aus diesen Gründen erfolgten Kontrollen des Perfusatgemisches und des Dialysates während des Versuches in Abständen von zehn Minuten direkt vor Ort mit dem Blutgasgerät.

Tabelle 4: Referenzwerte für das isolierte, hämoperfundierte Schafherz

Parameter	Referenzbereich	Literatur
Herzfrequenz(HF)	70 – 90 /min	Scheunert und Trautmann 1987
Organfluss (CBF/100g)	60-120 ml*min <sup>-1</sup> *100g <sup>-1</sup>	Scheunert und Trautmann 1987
pH (art.)	7,35 – 7,45	Kolb 1989
PO <sub>2</sub> (art.)	150 mmHg	Suaudeau und Kolobow 1975
PCO <sub>2</sub> (art.)	25 mmHg	Suaudeau und Kolobow 1975
Gesamt-Hämoglobin (Hb)	10 –13 g/dl	Kolb 1989
Hämatokrit (Hct)	30 – 34 Vol%	Kolb 1989
Na-Gehalt des Plasmas	144 mmol/l	Kolb 1989
K-Gehalt des Plasmas	4,6 mmol/l	Kolb 1989