

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Zur in vitro-Testung von Pharmaka

Die Methode der in vitro-Testung zum Relaxationseffekt von Pharmaka auf Myometriumgewebe und glatte Gefäßmuskulatur ist bereits etabliert. Das Gewebe wird in Streifen etwa der Größe 10x2x2 mm zugeschnitten und in ein System eingespannt, wobei ein Ende unbeweglich fixiert ist, das andere Ende jedoch beweglich mit einem Krafttransducer über einen dünnen Kunststoffaden verbunden ist.

Prüfkriterium ist letztendlich das Ausmaß der isometrischen Kraftentwicklung der einzelnen Muskelstreifen, welche durch die Fläche unter der vom PC aufgezeichneten Kontraktionskurve (AUC, area under the curve) jedes einzelnen Streifens repräsentiert wird.

Ursprünglich wurde die Versuchsapparatur von der I. Medizinischen Klinik der Charité (Kardiologie, Dr. med. Bruch) zur Verfügung gestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden an dem Gerät nur Testungen an zirkulärer Gefäßmuskulatur durchgeführt. Nach einer Überarbeitung des Gerätes und dem Einsatz von Spezialklemmen zur Fixierung der Muskelstreifen wurde seitdem Myometriumgewebe getestet, theoretisch wäre jedoch die Verwendung jeder Art von glatter Muskulatur denkbar.

### 2.2 Myometriumgewebe

Das Myometriumgewebe wurde von nicht-schwangeren Frauen, bei denen eine Hysterektomie zwischen Februar und Oktober 2003 durchgeführt wurde, nach deren schriftlicher Einwilligung (Formular siehe 9. Anlage) gewonnen.

Einschlusskriterien waren:

- Vor der Menopause
- Alter über 18 Jahre
- nach Aufklärung am Tag vor Hysterektomie und schriftlicher Einwilligung

Ausschlusskriterien:

- malignes Gewebe
- vorausgegangene Medikation mit Nitraten
- Bewusstseinstäubung/ nicht gegebene Geschäftsfähigkeit
- Infektionskrankheiten

Das Gewebe wurde mit Erlaubnis des Operateurs im OP aus dem unteren Uterinsegment des entnommenen Uterus geschnitten (ca. 3x5 cm). Blutreste wurden durch mehrmaliges Spülen mit Ringerlösung entfernt. Daraufhin folgte der Transport und die weitere Verarbeitung im Labor. Das Myometrium konnte in Ringerlösung bei einer Temperatur von 4°C bis zu 36 Stunden gelagert werden.

### 2.3 Probandinnen

Insgesamt wurden 25 Frauen im Alter zwischen 37 und 54 Jahren in das Patientinnenkollektiv für die Versuche eingeschlossen. Das durchschnittliche Alter lag bei ca. 45 Jahren.

Die Indikation zur Operation war in 21 Fällen Uterus myomatosus und in 4 Fällen Blutungsstörungen, bei 13 Patientinnen wurde eine abdominale und bei 11 Patientinnen eine vaginale Hysterektomie durchgeführt. Bei einer Patientin erfolgte eine Myomenukleation.

In allen Fällen konnte histologisch kein malignes Zellwachstum nachgewiesen werden.

Probandinnen	25
Alter	37-54 Jahre
Operationsindikation	21x Uterus myomatosus 4 x Blutungsstörungen
Operationsverfahren	1x Myomenukleation
	12x abdominale Hysterektomie sine adnexe
	1x abdominale Hysterektomie cum adnexe
	10x vaginale Hysterektomie sine adnexe
	1x vaginale Hysterektomie cum adnexe
Histologie	25x kein Hinweis auf malignes Zellwachstum
Art der Anästhesie	25x Intubationsnarkose

**Tabelle 1: Patientinnenkollektiv**

## 2.4 Substanzen

### Pharmaka:

- Atosiban = Tractocile® in Pulverform, aufgelöst in physiologischer Kochsalzlösung, 7,5 mg/ ml, Fa. Ferring
- Glyceroltrinitrat = Trinitrosan® 5mg/ ml (mit 77 Vol.-% Ethanol), Fa. Merck
- Nifedipin = Adalat® pro infusione 5mg/ 50ml (mit 18 Vol.-% Ethanol), Fa. Bayer

### Bestandteile der Organbadlösung:

- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), Puffersubstanz, Fa. Merck
- Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Fa. Merck
- D+-Glucose, wasserfrei, Fa. Merck
- Kaliumchlorid (KCl), Fa. Merck
- Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Fa. Merck
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Fa. Merck
- Natriumchlorid (NaCl), Fa. Merck
- Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), Fa. Merck
- Pyruvat, Mononatriumsalz, Fa. Boehringer

### Sonstige Substanzen:

- Ringerlösung, Fa. Braun zum Reinigen und Aufbewahren der Myometriumpuben
- verdünnte Salzsäure (HCl) zum Reinigen der Organbäder

## 2.5 Geräte

- 2 spitze kleine Pinzetten und kleine Präparierschere
- Stereolupe, Modell SZ40, Fa. Olympus
- Kaltlichtquelle Highlight 2000, Fa. Olympus
- Präparierschale mit Gummieinlage und Nadeln
- diverse Glas- und Eppendorfpipetten
- Digital-pH/ mV-Meter, Fa. NeoLab

- Laborwaage, Fa. Sartorius
- Wasserbad mit Thermostat, Fa. Haake
- Hugo Sachs F 30 Force Transducer

## 2.6 Computer und Programme

- PC Scenic Pro C5, Fa. Siemens Nixdorf
- PC Pentium II, Intel
- Uter Data, Iteration Informatik Technologien GmbH, Berlin
- SPSS 10.0®, Standard Version für Windows 1999, Chicago, Illinois
- Office 1997®, Microsoft

## 2.7 Versuchsapparatur

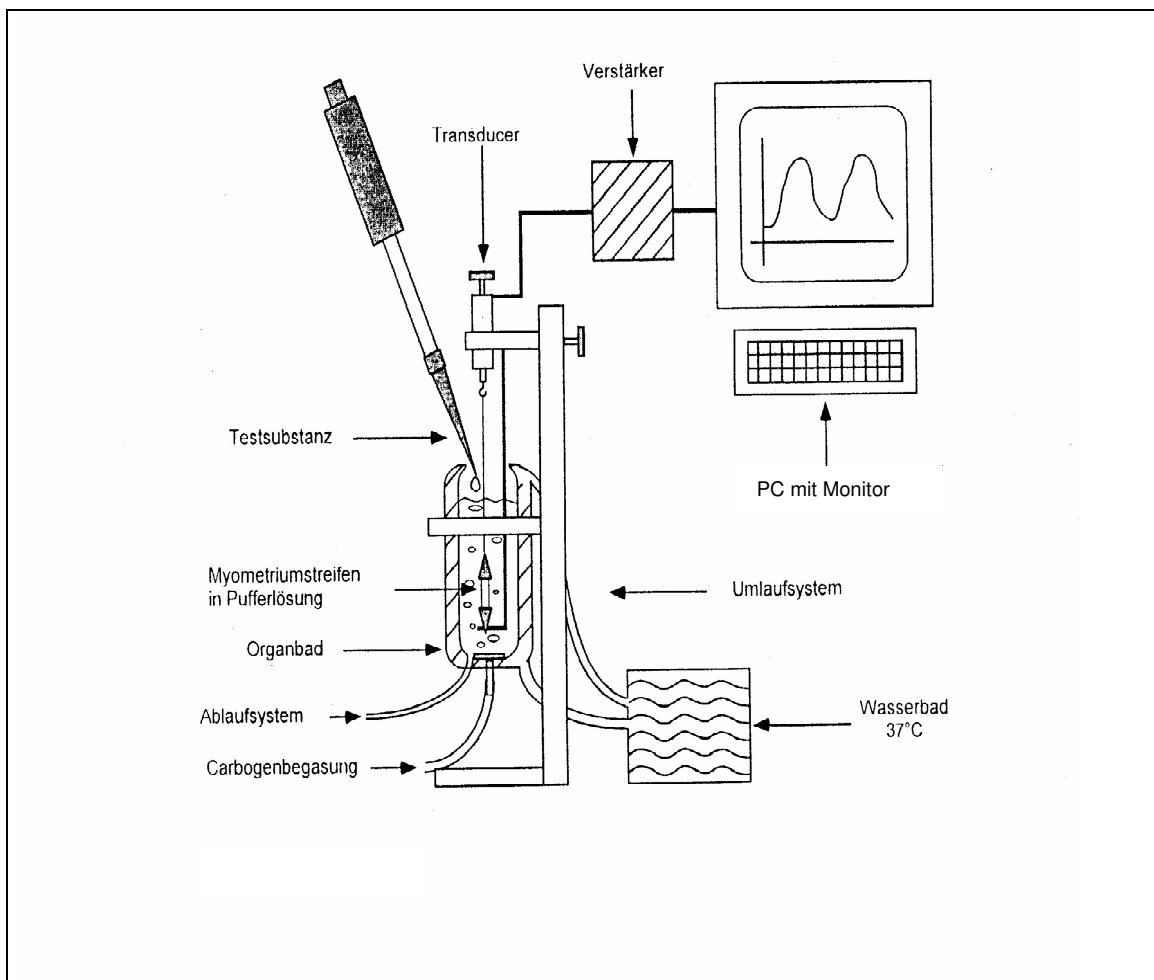


Abbildung 2: Schema der Versuchsapparatur

Für die Versuche wurde eine Apparatur mit sechs Organbädern nach Schuller verwendet (siehe Abb. 2). Die doppelwandigen Gefäße haben ein Fassungsvermögen von 12 ml und besitzen insgesamt vier verschiedene Stutzen für den Zu- und Ablauf des Wassermulauflaufsystems, die Begasung und Entleerung der Organbäder. Die Begasung erfolgt durch eine am Boden des Gefäßes befindliche Fritte mit einem Carbogen-Gasgemisch (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

Die Apparatur besitzt zwei voneinander getrennte Wassersysteme. Das Organbad steht als offenes System in Verbindung mit den Fritten und wird ständig begast. Das Wassermulauflaufsystem mit Thermostat ist geschlossen und dient der Beheizung der Gefäße, das durch die Doppelwandigkeit der Organbäder eine konstante Temperatur von etwa 37°C aufrecht erhält. Das Wasser in diesem System befindet sich durch eine integrierte Pumpe in ständiger Zirkulation. Mit diesem Versuchsaufbau wird versucht, ein annähernd physiologisches Milieu zu imitieren.

Die Nähr- und Spüllösung (s.u.) für die Organbäder wird im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C vorgewärmt, um ansonsten beim Spülen mögliche Kontraktionsreize durch Kälte zu vermeiden.

Das eine Ende des Präparates ist unbeweglich fixiert, während das andere Ende beweglich mit einem Krafttransducer (F 30, Fa. Hugo Sachs/ Freiburg) über einen dünnen Kunststoffaden verbunden ist. Das Ausgangssignal des Transducer wird verstärkt (durch einen Brückenverstärker) und mit Hilfe einer A/D-Wandlerkarte (6 Kanäle) über ein Windows-gestütztes Datenerfassungssystem (LabWin, Fa. Puhlmann Electronic/ Berlin) auf einem PC (Scenic pro C5, Fa. Siemens Nixdorf und Pentium II, Intel) abgespeichert. Gleichzeitig erfolgt die Darstellung der Messkurven auf dem PC-Monitor.

## **2.8 Experimenteller Ablauf**

### 2.8.1 Herstellung der Organbadlösung

Als Nähr- und Spüllösung dient eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung.

Sie wird vor Beginn des Versuchs hergestellt und kann bei einem pH-Wert im Bereich von 7,43 +/- 0,05 bis zu 72h nach dem Ansetzen verwendet werden.

Der aktuelle pH-Wert wird vor jeder Anwendung der Lösung mit dem pH-Meter geprüft.

Folgende Substanzen sind für die Zubereitung nötig:

- 3,6 g Glucose
- 2,8 g HEPES
- 13,6 g NaCl
- 2,18 g NaHCO<sub>3</sub>
- 0,44 g Pyruvat
- 5,0 ml CaCl<sub>2</sub> 1molar
- 6,0 ml KCl 10%
- 2,9 ml MgSO<sub>4</sub> 20%
- 3,26 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10%

Die gebrauchsfertige Organbadlösung entsteht, indem die o.g. Substanzen schließlich mit destilliertem Wasser auf 2000 ml aufgefüllt werden.

So ergeben sich in mmol/l die folgenden Konzentrationen:

NaCl 116; NaHCO<sub>3</sub> 24,9; CaCl<sub>2</sub> 1,5; MgSO<sub>4</sub> 2,4; Glucose 10,0; Pyruvat 2,5; HEPES 5,9.

### 2.8.2 Präparation der Myometriumstreifen

Die Myometriumprobe wurde, nachdem sie mit Ringer-Lösung gründlich von Blutresten befreit wurde, in einer Plastikschaale mit Organbadlösung unter einem Binokular in etwa 10x2x2 mm große Streifen geschnitten (in Verlaufsrichtung der Muskelfasern). War ausreichend Material vorhanden, konnten pro Probe teilweise zwei Versuche durchgeführt werden. Bei der Präparation war vor allem auf ein möglichst atraumatisches Vorgehen zu achten.

### 2.8.3 Versuchsdurchführung

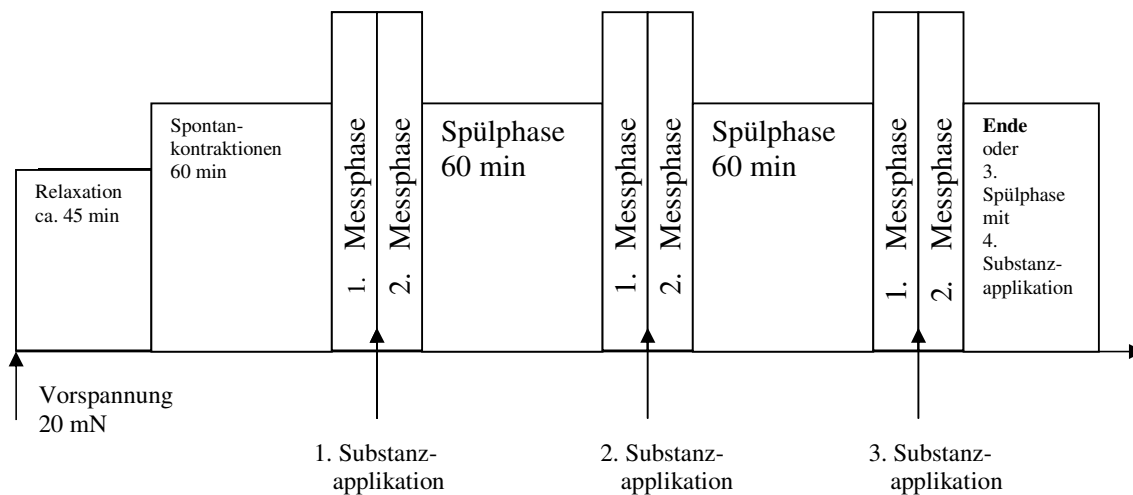
Die Myometriumstreifen wurden nach dem Einspannen in die Klammervorrichtung und dem Eintauchen in das Organbad einer Vorspannung von  $2000 \times 10^{-5}$  N ausgesetzt. Sank die Vorspannung eines Streifens unter  $500 \times 10^{-5}$  N, so wurde nochmals nachgespannt auf  $1000 \times 10^{-5}$  N.

Im Laufe der folgenden Stunde relaxierten die Streifen zunächst auf Werte zwischen  $700$  und  $1000 \times 10^{-5}$  N, zeigten dann aber in 84,2 Prozent der Fälle nach einem durchschnittlichen Zeitraum von etwa 40 min Spontankontraktionen. An diese Phase der Relaxation schloß sich eine Äquilibrierungsphase an, in der regelmäßige Spontankontraktionen über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde aufgezeichnet wurden. Bei stabilen Kontraktionsverhältnissen konnte nach dieser Stunde mit der Medikamentenapplikation begonnen werden.

Grundsätzlich erfolgte alle 30 min eine Spülung, d.h. ein vollständiger Austausch der Lösung im Organbad, wobei diese nicht in eine Messphase fallen durfte, um eine Verfälschung der Messwerte zu vermeiden.

In der ersten Messphase wurde die Spontanaktivität 15 min vor Zugabe des Medikaments, in der zweiten Messphase 15 min nach der Zugabe aufgezeichnet. Es folgte eine Spülphase von einer Stunde. Am betreffenden Streifen konnte nach dieser Zeit dieselbe Substanz, allerdings nur in derselben oder einer höheren Konzentration getestet werden. Es wurde damit pro Streifen nur eine Substanz zugegeben, um Wechselwirkungen zwischen den Medikamenten zu vermeiden.

Zeigte ein Streifen nach zwei Medikamentenzugaben noch eine ausreichend hohe Spontanaktivität von  $1500 \times 10^{-5}$  N, so wurde gegebenenfalls eine dritte und evtl. eine vierte Medikamentenzugabe nach gehabtem Schema (Abbildung 3) angeschlossen.



**Abbildung 3: schematische Darstellung des Versuchsablaufes**

#### 2.8.4 Kontrollversuche

In einigen Organbädern erfolgte keine Substanzapplikation. Lediglich die Spülungen wurden regelmäßig durchgeführt. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, inwieweit sich die Spontanaktivität der Myometriumbstreifen im Laufe des mehrstündigen Versuchs ändert, bzw. inwieweit unabhängig von Medikamentenzugaben Ermüdungserscheinungen auftreten. So konnte eine organbedingte Kontraktilitätsabnahme von einer substanzbedingten unterschieden werden. Die erste Messphase erfolgte während der ersten 15 min der Spontancontraktionen, die nächsten jeweils 30 min später. Es wurden pro Kontrollstreifen 4-6 Messphasen durchgeführt. Da die zweite Messphase vom Zeitablauf her am ehesten der Spontanaktivität bzw. der Ausgangsaktivität der regulären Versuchsstreifen entspricht, wurde diese als Vergleichswert herangezogen (d.h. mit 100% festgesetzt).

## 2.9 Auswertung und Statistik

Die Fläche unter der Kurve (=Area under the curve, AUC) bzw. das Integral in dem Messzeitraum von 15 min (900 s) diente als Maß für die Kontraktionskraft der Myometriumstreifen (siehe Abbildung).

In diesem Integral sind sowohl die Amplitude und Dauer als auch die Frequenz der Kontraktionen inbegriffen. Die erste Messphase (15 min vor Medikamentenzugabe) wurde als Ausgangsaktivität der Streifen mit 100% festgelegt, die zweite Messphase (15 min nach Medikamentenzugabe) diente der Bestimmung der Restaktivität im Vergleich zur Ausgangsaktivität (in Prozent). Durch Subtraktion dieser prozentualen Restaktivitäten von 100 berechnet man den Grad der Hemmung durch die zugegebene Substanz bzw. die Relaxation der Myometriumstreifen.

In Abbildung 4 ist ein Beispiel für die Auswertung einer Messung an der Kontraktionskurve eines Myometriumstreifens dargestellt.

Mit Hilfe der Software Uterdata® (Iteration GmbH, Berlin) wurden die Integrale berechnet durch Addition der einmal pro Sekunde registrierten Werte (in  $10^{-5}$  N) innerhalb der festgelegten Messphasen.

Die statistische Aufarbeitung der Versuchsergebnisse erfolgte über das Programm SPSS® 10.0 Standard Version für Windows 1999 Chicago, Illinois.

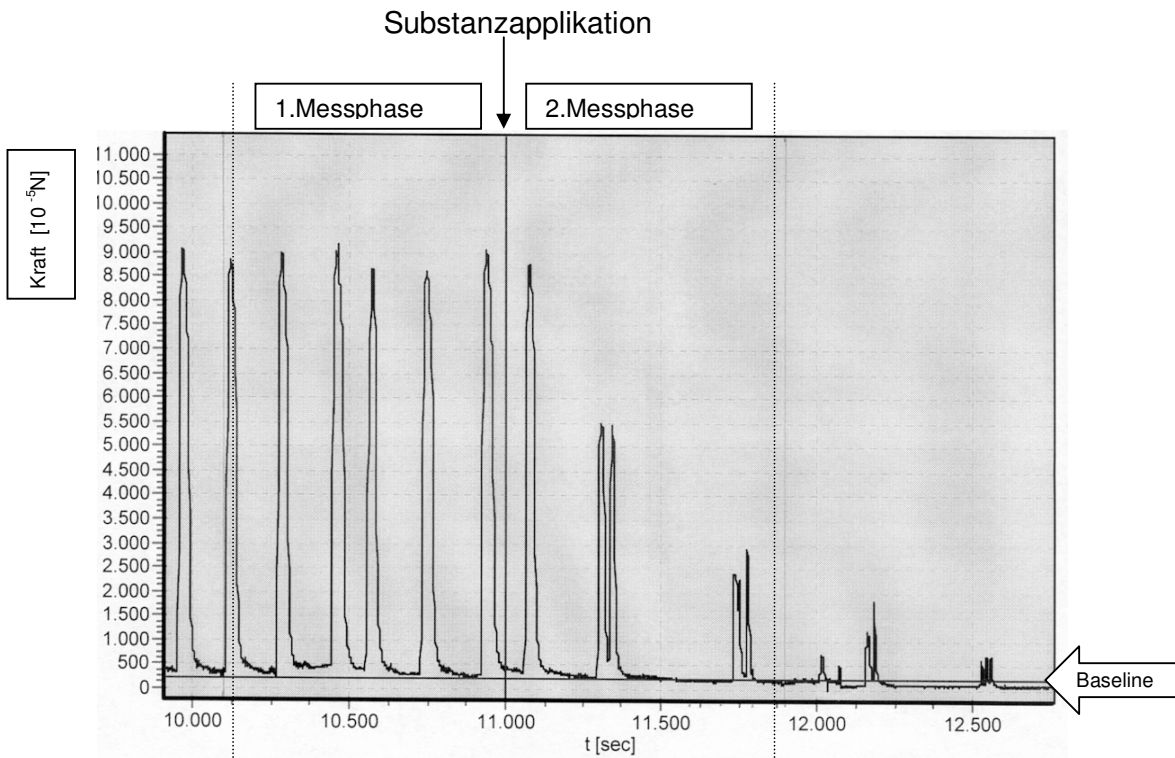
Als beschreibendes Lagemaß der Verteilung der Kontraktionskraft wurde der Median sowie die 25. und die 75. Perzentile angegeben.

Der Signifikanzprüfung diente der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für ordinal skalierte Daten mit folgenden Signifikanzgrenzen:  $p < 0,01$  = hochsignifikant

$p < 0,05$  = signifikant

$p > 0,05$  = nicht signifikant





**Abbildung 4: Beispiel für die Auswertung einer Messung**

*Applikation von Nifedipin bei 11000 sec, Konzentration im Organbad: 100 ng/ml*

*1. Messphase: Spontanaktivität, Integral= 1.603.712= 100%*

*2. Messphase: Restaktivität, Integral= 481.720 = 30,04%*

### 2.9.1 Begriffserklärungen

<b>Begriff</b>	<b>Erklärung</b>
<b>Spontanaktivität = Ausgangsaktivität</b>	Integral der 1. Messphase, 15 min vor Medikamentenzugabe, festgesetzt mit 100%
<b>Restaktivität</b>	Integral der 2. Messphase, erste 15 min nach Medikamentenzugabe, angegeben in % der Ausgangsaktivität
<b>Hemmung = Relaxation</b>	Grad der Aktivitätseinbuße in % Ausgangsaktivität - Restaktivität
<b>Kontraktilität</b>	Fähigkeit zur Kontraktion, Muskelverkürzung

**Tabelle 2 : Begriffserklärungen**