

3. Material und Methode

Die Prüfsubstanzen Diclofenac und Polidocanol werden im Modell der isoliert perfundierten Leber getestet. Dazu werden insgesamt 18 Organe autolog perfundiert. Es werden sechs Organe ausschließlich zur Gewinnung von Kontrolldaten (Kontrollen) perfundiert. Damit soll der zeitliche Ablauf der Funktionseinbußen ohne Substanzgabe dokumentiert werden.

Gruppenbildung:

6 Lebern = Kontrollen

6 Lebern = Polidocanol

6 Lebern = Diclofenac

3.1 Organbeschaffung

Die Lebern werden von Schweinen gewonnen, die regulär zum Schlachten ausgemästet wurden. Die Tiere werden unabhängig vom Geschlecht ausgewählt. Im Durchschnitt sind die Tiere sechs bis acht Monate alt und wiegen am Tag der Organgewinnung $85,77 \pm 9,37$ kg. Bei der Auswahl der Tiere werden adspektorisch der Körperstatus und das Verhalten als Kriterium herangezogen.

Es werden nur Tiere verwendet, die aufmerksam und an der Umgebung interessiert erscheinen. Wichtiges Kriterium ist auch die Bewegungsfreude. Die Tiere sollen eine dem Alter entsprechende Statur aufweisen. Nach Verbringen in einen vom übrigen Schlachtbetrieb abgeschirmten Raum werden die Schweine mit einer Weinberg'schen Zange acht Sekunden lang mit mindestens 250 Volt und 1,25-1,5 Ampère betäubt. Anschließend erfolgt das Anschlaufen. Hierbei wird das Schwein an einem Hinterlauf in Höhe des Tarsalgelenks mit einer Zugkette befestigt und innerhalb von 30 Sekunden zum Stechplatz befördert. Das Entbluten erfolgt durch Eröffnen der großen Halsgefäße. Zu diesem Zweck wird mit einem Schlachtermesser ca. vier cm cranial des Sternums in der Medianen am hängenden Tier eingestochen.

Es werden zwei weitere Versuche mit Laborschweinen im OP der tierexperimentellen Einrichtungen der Charité, Campus Virchow Klinikum, durchgeführt. Diese Tiere werden mit

Trapanal¹ prämediziert, anschließend intubiert und mit Hilfe einer Inhalationsnarkose aus Enflurane², Stickoxydul und Sauerstoff in Narkose gehalten. Es folgt die Entnahme verschiedener Organe durch die entsprechenden Forschergruppen, wobei die Entnahme der Leber zuerst stattfindet. Eine Menge von 2,5 – 3,0 Liter Eigenblut des Tieres werden in einer mit 140.000 IE Heparin³ präparierten Metallschüssel unter ständigem Rühren aufgefangen. Es wird nur das Strahlblut aufgefangen. Das so gewonnene Blut wird dann in 1-Liter-Flaschen, versetzt mit 40.000 IE Heparin, abgefüllt und durch vorsichtiges Rollen der Flaschen vermengt. Das Schwein wird dann auf einem Schlachtbock in Rückenlage verbracht. Es erfolgt die Öffnung von Bauch- und Brusthöhle. Hierbei wird die Mediane von cranial über dem Sternum bis zur Inguinalgegend mit einem Messer eröffnet. Das Sternum muss teilweise mit einer Säge durchtrennt werden. Die V. cava caudalis wird freipräpariert. Anschließend werden die Lnn. portales aufgesucht und die V. portae und die A. hepatica ertastet. Entlang der Magenkurvatur wird bis zum Zwerchfell präpariert und anschließend die A. hepatica und V. portae durchtrennt. Danach erfolgt die Umschneidung des Zwerchfells entlang seines Sehnenspiegels bis zur Medianen. Die V. cava cranialis wird so weit wie möglich herzwärts durchtrennt. Es folgt nun die Präparation entlang der Zwerchfellspeiler und deren Durchtrennung. Bei der Entnahme wird jeglicher unnötiger Zug bzw. Druck auf das Organ vermieden (HELLINGER et al., 1997; IKEDA et al., 1992; KAHN et al., 1996; SCHÖN et al., 1993). Die Warmischämie dauert im Durchschnitt $18,08 \pm 7,35$ Minuten. Die Leber wird dann in eine mit einer Plastikfolie ausgeschlagene Kunststoffwanne gelegt, und gewogen. Das umhüllte Organ wird danach auf ein Eisbett gelegt. Direkt im Anschluss wird nun die V. portae mit einem vorbereiteten Polyethylenschlauch, Durchmesser ca. acht Millimeter, drei Zentimeter vor der Mündung in die Leber kanüliert. Anschließend erfolgt die Kanülierung der A. hepatica mit einem zugeschnittenen Perfusionsschlauch (\varnothing 0.3 mm). Beide werden dann mit 4° C kalter Euro-Collins-Lösung (Zusammensetzung s. Tab. 3) durchspült. Dabei wird die V. portae mit drei Litern und die A. hepatica mit zwei Litern perfundiert. Die Konservierungslösung enthält 40.000 IE Heparin. Die Spülzeit beträgt 41 ± 9 Minuten.

Nach der Perfusion wird das Organ in der Konservierungslösung schwimmend auf Eis gelagert und zum Transport in eine Styroporbox verbracht (BELL et al., 1994; BELL et al., 1997; BELZER und SOUTHARD, 1988; HARRIS et al., 1982; HASSELGREN, 1987; HERMANN, 1999; KLÖPPEL et al., 1994; OTTO et al., 1986; STEFFEN et al., 1990). Die

¹ Fa. Byk Gulden Lomberg, Chem. Fabrik GmbH, Konstanz

² Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen

³ Liquemin® N 25000, Hoffman-La Roche AG, Grenzach-Whylen

Kaltischämie dauert inklusive Transportfahrt zurück zum Institut durchschnittlich $170,23 \pm 15,40$ Minuten.

Es werden zusätzlich zwei Versuche mit Laborschweinen im OP unseres Instituts mit Diclofenacbehandlung durchgeführt. Das Entnahmeprozedere wird hier wie oben beschrieben beibehalten. Die Dauer der Kaltischämie beschränkt sich hier jedoch nur auf die Spülzeit mit der Konservierungslösung.

3.2 Perfusionsaufbau und hämodynamische Parameter

Der Aufbau besteht aus zwei Teilen (s. Schemazeichnung Abb. 2). Auf der einen Seite des Aufbaues befindet sich der Blutkreislauf (s. Abb. 3), auf der anderen Seite der Dialysatkreislauf (s. Abb. 4) mit dem Organ. Beide Kreisläufe sind über die drei Dialysatoren miteinander verbunden.

Zunächst soll der Blutkreislauf beschrieben werden:

Das Blut gelangt aus dem Reservoir durch zwei Schlauchventilpumpen⁴ gefördert in die drei parallel angeordneten Dialysatoren⁵ (s. Photo Abb. 1).

⁴ Schlauchventilpumpe, Labor für Biofluidmechanik der Charité

⁵ F7, Fresenius®



Abb. 1: Photo der doppelten Schlauchventilpumpe nach Affelt, K.

Das Reservoir fasst 2,5 l Eigenblut des Tieres. Diesem werden je nach Ergebnis der Blutgasanalyse bis zu 0,5 Liter 0,9%-ige NaCl-Lösung zugesetzt. Hinter den Dialysatoren wird der Blutstrom aufgeteilt. Der Anteil des Blutes der in die Vene fließt gelangt zunächst in eine Luftfalle (T) und durchfließt dann den Druckaufnehmer, bevor es über die V. portae in das Organ eintritt.

Der zweite Teil des Blutstromes fließt durch den Flussmesser⁶ über eine einkammerige Schlauchventilpumpe in die zweite Luftfalle (T). Auch hier wird anschließend ein Druckaufnehmer durchflossen, bevor das Blut über die A. hepatica in das Organ gelangt. Das Blut tritt über die V. cava caudalis aus und erreicht dann das Reservoir. Zur Entnahme der Blutproben wurde ein Dreiwegehahn eingebaut (V, A).

⁶ Transonic Flowprobe, Transonic Systems Inc.

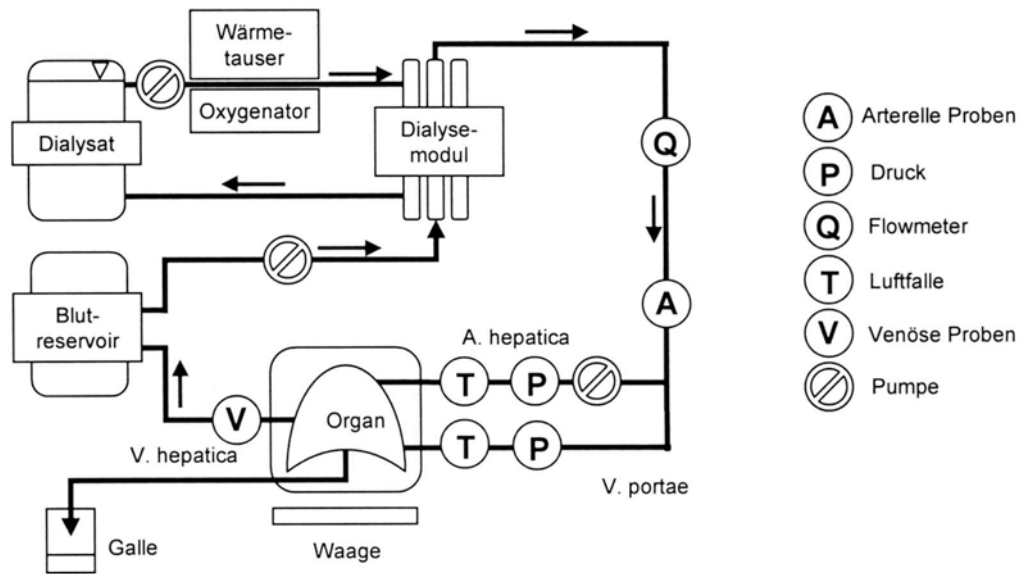


Abb. 2: Schemazeichnung des Aufbaus mit Dialysatkreislauf und Organkreislauf.



Abb. 3: Photo des Aufbaus, hier der Organkreislauf



Abb. 4: Photo des Aufbaus, hier der Dialysatkreislauf

Der Dialysatkreislauf wird mit sechs Litern Dialysat befüllt. Von dem Dialysatreservoir führt eine Ableitung zum Oxygenator wo das Dialysat angewärmt und mit Sauerstoff versetzt wird. Das Dialysat wird über eine Pumpe in den Oxygenator⁷ geleitet. Hier wird es über das Gegenstromprinzip mit Hilfe von Warmwasser auf 37°C aufgewärmt und gleichzeitig oxigeniert. Eine Sauerstoffflasche ist dem Oxygenator direkt angeschlossen und reichert das Dialysat zu 100% mit Sauerstoff an. Es wird ein O₂ - Fluss von 0,5 l/Minute eingestellt. Eine Heizspirale erwärmt das Wasser für den Oxygenator- und den Wasserkreislauf. Der Wasserkreislauf speist das Wasserbett, auf welchem das Organ während des Versuchs ruht. Ist der Oxygenator passiert, fließt das Dialysat parallel durch die drei Dialysatoren. Hierbei umfließt es die darin enthaltenen Kapillaren. Blut und Dialysat kommen hierbei nach dem Gegenstromprinzip nur indirekt miteinander in Kontakt. Dabei kommt es zum Stoffaustausch aufgrund des herrschenden Konzentrationsgefälles. Glukose und Elektrolyte werden vom Dialysat an das Blut abgegeben. Abbauprodukte werden vom Dialysat aufgenommen und in

⁷ Jostra M5, Medtronic Inc.

das Reservoir transportiert. Nachdem der Stoffaustausch mit dem Blut des Tieres stattgefunden hat wird das Dialysat dem Dialysatreservoir wieder zugeleitet. An dieser Zuleitung werden über einen Dreiwegehahn die Dialysatproben entnommen (D). Kurz vor Eintritt in das Reservoir werden im Dialysat mit Hilfe von Sonden⁸ die Temperatur und der pH gemessen.

3.3 Vorbereitung der Perfusionskreisläufe

Die pH-Sonde muss vor Versuchsbeginn kalibriert werden, bevor sie in den Dialysatkreislauf, wie oben angegeben, eingebaut werden kann. Zunächst wird der Heizwasserkreislauf befüllt und auf 38°C aufgewärmt. Der Wasserbettzulauf wird an das Wasserbett für das Organ angeschlossen. Über dieses Wasserbett wird nach Befüllung mit Warmwasser eine Plastikfolie gespannt und das Organ darauf gelegt. Das Dialysat wird zunächst auf 37°C erwärmt und der Dialysatkreislauf mit den oben genannten sechs Litern Dialysat befüllt. Hierbei muss auf eine sorgsame Entlüftung des Systems geachtet werden. Der Kreislauf wird geschlossen und die Motoren angeschaltet.

Bevor der Blutkreislauf befüllt wird, muss der Dialysatkreislauf ausgeschaltet werden. Es kommt sonst zum Unterdruck im System und damit zum Übertritt von Dialysat in den Blutkreislauf. Der Blutkreislauf wird mit einem Liter 0,9%iger NaCl-Lösung⁹ befüllt, welches mit 80.000 IE Heparin versetzt wurde, um eine Gerinnung des später zirkulierenden Blutes zu verhindern. Im Wasserreservoir werden drei Liter Ringer-Laktat-Lösung¹⁰ auf 37°C erwärmt. Diese werden beim „warm-rinsing“ als Spüllösung für die Leber verwendet. Als Reservoir für das Blut dient ein präparierter PVC-Beutel. Dieser wird nun mit 120.000 IE Heparin versetzt. Danach werden 2,5 Liter des Eigenblutes des Tieres über einen Filter¹¹ laufend eingefüllt und 0,5 Liter NaCl zugesetzt. Während des Versuches werden kontinuierlich arterieller und venöser Druck, die Flussgeschwindigkeit in der A. hepatica und V. portae gemessen und mit einem Computer¹² aufgezeichnet (s. Abb. 5).

⁸ GPRT 1400 A, Greisinger electronic

⁹ Ecotainer®, B.Braun AG, Melsungen

¹⁰ Ringer-Laktat-Lösung nach DAB 7, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen

¹¹ Sangofix® N, Fa. Braun

¹² Laptop: Macintosh Power Book 1400 Series, Apple®Computers, Inc.



Abb. 5: Photo einer Übersichtsaufnahme vom Computer inkl. Aufbau

Der Blutfluss wird auf 1 ml/g Leber/min eingestellt. Das Messintervall der Flüsse beträgt zwei Sekunden. Diese werden gemittelt und jede Minute ein Messwert angegeben. Das Programm zur Messung wurde speziell für die Versuchsreihe entwickelt.

3.4 Vorbereitung des Organs

Vor der Perfusion wird die Leber erneut gewogen. Die V. cava caudalis und der Ductus choledochus werden kanüliert. Gleichzeitig wird das Organ auf Entnahmeschäden untersucht und evtl. Verletzungen an den Gefäßen ligiert¹³. Nun wird die Leber auf das 37°C warme Wasserbett gelegt und die Verbindungen zum Perfusionskreislauf geschlossen. Hierbei wird auf luftblasenfreie Verbindung der Schläuche Wert gelegt.

Es folgt nun das „warm rinsing“. Das Organ wird mit den oben genannten drei Litern 37°C warmer Ringer-Laktat-Lösung durchgespült. Hierzu wird der vom späteren Blutreservoir kommende Schlauch in die Ringer-Laktat-Flasche eingetaucht. Das Ringer-Laktat wird somit durch das Schlauchsystem gepumpt, wobei das darin befindliche NaCl durch das Organ hindurchgepumpt wird. Die Spülung entfernt die Konservierungslösung und bringt das Organ

¹³ Vicryl®, Ethicon

auf Körpertemperatur. Das anfallende Effluat (NaCl, Ringer-Laktat und verdünntes Blut) wird getrennt aufgefangen und dann verworfen. Während dieser Spülphase ist es notwendig, auch den Dialysatkreislauf anzufahren, da es sonst durch den dort fehlenden Druck im Gesamtsystem zu einem Unterdruck kommt. So würde Dialysat auf die Blutseite gelangen. Vor Anschluss des Blutreservoirs wird der Dialysatkreislauf angehalten. Nach der Ringer-Laktat-Perfusion kann der auf 37°C temperierte Eigenblutkreislauf angeschlossen werden. Der Eigenblutkreislauf wird erst dann mit dem Reservoir verbunden, wenn die aus dem Organ fließende Flüssigkeit Blutcharakter annimmt. Sichtbar werdende Sickerblutungen am Hilus werden ligiert.

3.5 Verwendete Substanzen

3.5.1 Konservierungslösung: Euro-Collins-Lösung

Die Euro-Collins-Lösung wird vor jedem Versuch nach dem unten genannten Rezept zusammengestellt und bis zum Versuchstag im Kühlschrank gelagert. Zusätzlich wird noch Ringer-Laktat-Lösung¹⁴, hergestellt nach DAB, zur Spülung des Organs vor Perfusionsbeginn genutzt. Der pH der Euro-Collins-Lösung beträgt 7,25.

Substanz	Molmasse (g/mol)	Menge (mmol/l)	Menge (g/5l)
K ₂ HPO ₄	174,18	42,5	37,01
KH ₂ PO ₄	136,09	15	10,21
NaHCO ₃	84,01	10	4,2
KCl	74,55	15	5,59
D(+)-Glukose	180,16	3,5	175

Tab. 1: Zusammensetzung der Euro-Collins-Lösung.

3.5.2 „warm rinsing“-Lösung: Ringer Laktat-Lösung

Die eingesetzte Ringer-Laktat-Lösung wird nach DAB 7 als Infusionslösung zur intravenösen Infusion hergestellt. Die Bestandteile können der nachfolgenden Auflistung (Tab. 2) entnommen werden. Die Osmolalität der Lösung wird mit 280 mosmol/kg angegeben.

Bestandteile	Menge (g/l)
NaCl	6,00
KCl	0,40

¹⁴ Delta Pharma GmbH

CaCl ₂	0,27
Na-Laktat	6,10

Tab. 2: Zusammensetzung der Ringer-Laktat-Lösung.

3.5.3 Dialysat

Substanz	Molmasse (g/mol)	Menge (mmol/l)	Menge (g/10 l)
NaCl	58,44	103,00	60,19
KCl	74,55	2,90	2,16
CaCl ₂ * 2H ₂ O	147,00	1,50	2,21
MgCl ₂ * 2H ₂ O	203,30	0,50	1,02
NaHCO	384,01	37,00	31,08
NaCH ₃ COO	82,03	2,50	2,05
D-Glucose	180,16	3,55	6,40

Tab. 3: Zusammensetzung Dialysat.

Die Lösung wird im eigenen Labor vor jedem Versuch frisch nach dem oben genannten Rezept zusammengestellt und bis zum Versuchstag im Kühlschrank gelagert.

3.5.4 Polidocanol

Polidocanol, chemisch bezeichnet auch als Aethoxysclerol^{®15}. Hier wird die 0,5%ige Konzentration verwendet. Die Injektionslösung enthält 5 mg Polidocanol, 84 mg Ethanol, Natriummonoxyhydrogenphosphat, 2 H₂O, Kaliumdihydrogenphosphat und wässrige Lösung. Die Menge von Polidocanol beträgt 5 mg, also 25 ml der Injektionslösung á 0,5%. Das entspricht $8,3 \times 10^{-6}$ mol.

3.5.5 Diclofenac

Diclofenac-ratiopharm^{®16} liegt in Form einer 2 ml Ampulle als Injektionslösung vor. Diese enthält 75 mg Diclofenac-Natrium. Die Konzentration von Diclofenac beträgt $2,36 \times 10^{-4}$ mol. Es werden also 2,2 ml in das Perfusionsmedium und 8,0 ml in das Blut gegeben.

3.5.6 Blutgerinnungshemmer: Heparin

Heparin, ein Blutgerinnungshemmer wird in Form einer handelsüblichen Injektionslösung angewendet. Pro Ampulle sind in 5 ml einer wässrigen Suspension 25.000 IE Heparin, sowie 50 mg Benzylalkohol als antimikrobielles Konservierungsmittel enthalten.

¹⁵ Fa. Kreussler

¹⁶ Ratiopharm

3.6 Kochsalz-Lösung

Der Blutkreislauf wird mit handelsüblicher 0,9%iger Natriumchloridlösung befüllt.

3.7 Versuchsablauf

Der Zeitpunkt der endgültigen Schließung des Blutkreislaufes wird als Versuchsbeginn notiert.

In den Vorversuchen erfolgt alle 15 Minuten eine Blutentnahme für die Blutgasanalyse (BGA) und alle 30 Minuten eine Entnahme arteriellen und venösen Blutes sowie von Dialysat. Die Leber wird 180 Minuten perfundiert.

Vor der Eigenblutperfusion wird zunächst eine Probe aus dem Blut entnommen (p_0) und eine Blutgasanalyse angefertigt. Das Blutreservoir wird auf das beheizte Wasserbett gelegt und so wieder auf 37°C erwärmt. Um eine Homogenität des Blutes zu gewährleisten, wird das Reservoir während des Versuches auf eine Blutschaukel gelegt.

Bei den Pharmakaversuchen wird die Versuchsdauer variiert, da die Wirkweise beider Substanzen sehr unterschiedlich ist.

Polidocanol verursacht aufgrund seiner bekannten Toxizität einen starken Leberschaden. Aus diesem Grund beträgt die Versuchszeit hier nur 90 Minuten, davon 30 Minuten Vorlaufzeit. Hier erfolgt die Blutentnahme zur Blutgasanalyse (BGA) alle 15 Minuten. Proben arteriellen und venösen Blutes, sowie Proben vom Dialysat werden alle 30 Minuten entnommen. Polidocanol wird als 0,5%ige ethanolhaltige Lösung¹⁷ in einer einmaligen Bolusgabe in das Blutreservoir injiziert. Ein Austausch auf die Dialysatseite ist hier aufgrund der Teilchengröße nicht möglich.

Es wird erwartet, dass Diclofenac die Leber erst nach längerer Einwirkzeit schädigt. Daher beträgt die Versuchsdauer hier 180 Minuten, davon 60 Minuten Vorlaufzeit.

In der Versuchsphase werden im 15-Minutenintervall Blutgasanalyseproben und im 30 Minutenintervall Blutlabor- und Dialysatproben entnommen. Diclofenac (Diclofenac-ratiopharm) wird als Bolus in das Blut- und Dialysatreservoir gegeben, da eine Passage von

¹⁷ Aethoxysklerol®

Diclofenac durch die Dialysatoren möglich ist. Hier werden ebenfalls im 15 Minutenintervall Blutgasanalyseproben und im 30 Minutenintervall Blutlaborproben entnommen.

Sofort nach Versuchsende wird die Leber gewogen. Es werden Gewebeproben zur histologischen Untersuchung entnommen, deren Untersuchung Thema einer anderen Arbeit ist. Die Gewebeproben haben eine Größe von 0,5 cm³. Die Fixation erfolgt in 4%igem, gepuffertem Formalin¹⁸. Proben werden aus einem großen Lappen mittig, aus einem Randbezirk, aus dem Hilusbereich, aus dem Bereich des Gallenblasenzulaufes und aus der Gallenblasenwand entnommen.

3.8 Untersuchungsparameter

3.8.1 Bestimmung Gallenmenge

Die Bestimmung der Gallenmenge erfolgt gravimetrisch: vor Versuchsbeginn werden die 10 ml fassenden Probenröhrchen gewogen und die Differenz zu den mit Galle gefüllten Probengefäßen gebildet. Die Dichte der Galle entspricht nahezu eins, daher kann das Gewicht der Galle dem Volumen gleichgesetzt werden.

3.8.2 Blutgasparameter

In der folgenden Tabelle werden die Messparameter bei der Blutgasanalyse (BGA) aufgezählt. Die Messung der Parameter erfolgt während des Versuches alle 15 Minuten.

¹⁸ Fa. Herbata Arzneimittel

Parameter	Bezeichnung
art./ ven. Blutgase	pO ₂ pCO ₂
Säure-Basen-Haushalt	HCO ₃ ⁻ Base Excess pH
Elektrolyte	Kalium, Kalzium

Tab. 4: Messparameter bei der Blutgasanalyse der Polidocanol- und Diclofenacversuche.

Die Blutproben (1-2 ml) für die Blutgasbestimmung werden an der Zuführungsstelle zum Reservoir entnommen. Die Messung erfolgt direkt nach der Entnahme. Hierzu wird der Spritze ein Gerinnsel-fänger¹⁹ vorgesetzt und das Blut zur Analyse in das Gerät²⁰ gegeben.

3.8.3 Klinisch-chemische und hämatologische Parameter

Die Qualitätskontrollen und Untersuchungen der Einzelparameter werden vom Institut für Laoratoriumsmedizin und Pathobiochemie²¹ der Charité Berlin durchgeführt. Die Untersuchung der Dialysatproben erfolgt nach den gleichen Bestimmungsmethoden, wie die der klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter.

Enzyme: AST, ALT

Die Bestimmung von AST (Testkombination: AST[®]), ALT (Testkombination: ALT[®]) erfolgt mit Testkombinationen von Roche. Hierbei handelt es sich um optimierte UV-Tests nach standardisierter Methode. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, bzw. müssen durch Zusatz von Aqua dest. gebrauchsfertig gemacht werden. Die Qualitätskontrolle erfolgt ebenfalls mit vom Hersteller empfohlenen Testkits²².

Elektrolyte: Kalium und Kalzium

Die Bestimmung von Kalium und Kalzium erfolgt mit Hilfe von Testkits der Firma Roche, Name: Kalium[®], bzw. Kalzium[®]. Es handelt sich hierbei um Trockenchemiestäbchen. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit einer entsprechenden Testkombination des Herstellers²³. Es ist zu erwähnen, dass die flammenphotometrische Bestimmung von Kalium deutlich präziser ist. Diese Art der Kaliumbestimmung ist zeitaufwendig und daher im Notdienst nur schwer

¹⁹ Clot Catcher, Radiometer Copenhagen

²⁰ Radiometer Copenhagen ABL[™] 505, OSM₃ Radiometer Copenhagen

²¹ Campus Virchow Klinikum der Med. Fakultät der HU Berlin, Leitung: Prof. Dr. E. Köttgen

²² Validate N[®]

²³ Precinorm[®]U

durchzuführen. Die Abweichungen der Werte bei den genannten Bestimmungsmethoden ist jedoch so gering, dass auf eine flammenphotometrische Bestimmung verzichtet werden konnte.

Harnpflichtige Substrate: Harnstoff, Kreatinin

Die Bestimmung der harnpflichtigen Substrate erfolgt nach der Methode eines kinetischen UV-Tests mit Testkombinationen von Roche, hier UREA/BUN[®] und KREA[®]. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit entsprechenden Testkits¹⁸.

Leberfarbstoff: Bilirubin

Die Bestimmung des Leberfarbstoffes Bilirubin erfolgt mit Testkombinationen von Roche, hier BIL-T[®]. Die Reagenzien sind teilweise gebrauchsfertig, bzw. müssen durch Zusatz von Aqua dest. fertig gestellt werden. Das Bilirubin wird mit Hilfe der Detergenzien freigesetzt und dann mit Diazoniumverbindungen zu dem entsprechenden Azobilirubin gekoppelt. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit entsprechenden Testkits¹⁸.

Blutzellen: Erythrozyten

Zur Bestimmung der Erythrozytenzahl wird das automatisierte Verfahren nach dem kondumetrischen Prinzip (Impedanz-, oder Widerstandsmethode, bekannt als Coulter-Prinzip) angewandt. Es wird hierbei eine Blutverdünnung durchgeführt und diese Verdünnung dann durch den Transducer (Messwandler) geschickt. Bei Durchtritt einer Zelle verändert sich kurzzeitig der Widerstand und damit die Stromstärke, was von einer Elektrode gemessen und an eine Zählinheit weitergeleitet wird. Die Stärke des Signals ist proportional zum Partikelvolumen.

Hämoglobin und Hämatokrit

Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes wird mit einem Testkit (Tina-quant HBA1C II[®]) der Firma Roche durchgeführt. Der Nachweis erfolgt nach einem turbidimetrischen immunologischen Inhibierungsassay (TINIA[®]). Die Qualitätskontrolle wird mit entsprechenden Testkits durchgeführt²⁴. Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgt mit der Mikrohämatokritmethode mit Hilfe einer Mikrozentrifuge²⁵.

Laktat

²⁴ HBA1C

²⁵ Hettich Haematokrit

Der Laktatgehalt wird mit LAC[®]-Analyseplättchen der Firma Vitros trockenchemisch nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um einen calorimetrischen Test. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit Vitros Performance Verifier.

Gesamtprotein und Albumin

Die Bestimmung der Gesamtproteinfraktion und von Albumin wurde mit Testkombinationen von Roche, hier PROT[®] und ALB[®] durchgeführt. Die Reagenzien sind teilweise gebrauchsfertig, bzw. müssen durch Zusatz von Aqua dest. fertig gestellt werden. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit entsprechenden Testkits¹⁸.

Glukose

Die Glukosekonzentration wird trockenchemisch gemessen. Es werden die Testkombinationen von Roche verwendet. Hierzu wird ein Testkit Name GLUC[®] verwendet. Es handelt sich hierbei um Trockenchemiestäbchen. Zu Grunde liegt hier die Glukosoxidase-Peroxidasemethode. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit Precinorm[®] U.

3.9 Statistische Auswertung

Die Parameter werden während des Versuches mit dem Blutgasanalysegerät bestimmt um die Qualität der Perfusion direkt einschätzen zu können. Zusätzlich werden auch Proben entnommen, die im Labor bestimmt werden. Nur die Laborbefunde werden hier ausgewertet.

Aus den Einzelwerten der jeweiligen Versuche wird für den entsprechenden Untersuchungszeitpunkt das arithmetische Mittel (\bar{x}) und die Standardabweichung (s) zu bestimmten Entnahmezeitpunkten berechnet. Es handelt sich hierbei um die Zeitpunkte 0., 30., 60. und 90. Minute bei den Polidocanolversuchen und zusätzlich 120., 150. und 180. Minute bei den Kontroll- und Diclofenacversuchen.

Um diese Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wird ein statistischer Lagetest verwendet. Die Versuchszahl in der jeweiligen Gruppe ist mit jeweils sechs Tieren relativ gering. Eine Überprüfung der Einzelwerte auf das Vorliegen einer Normalverteilung ist daher nicht möglich. In solchen Fällen werden nicht parametrische Verfahren den parametrischen Tests vorgezogen. Im vorliegenden Fall wird deshalb ein verteilungsunabhängiges Verfahren verwendet, der Mann-Whitney-Rangtest, wie er bei Lorenz und Guggenmoos-Holzmann und Wernecke dargestellt wurde (GUGGENMOOS-HOLZMANN und WERNECKE 1995; LORENZ, 1996).

Zur Beurteilung des Einflusses eines Pharmakons auf diverse Parameter, werden die Differenzen der Werte 30 bzw. 60 Minuten nach Gabe des Pharmakons zum Wert unmittelbar vor der Gabe des Pharmakons gebildet, um mögliche Unterschiede in den Ausgangswerten zu berücksichtigen. Ein positiver Wert steht dabei für einen Anstieg, ein negativer Wert für einen Abfall des betreffenden Parameters.

Um den Einfluss des Pharmakons auf die einzelnen Parameter zu untersuchen, werden sowohl für die Kontrollen, als auch die jeweilige Pharmakongruppe jeweils folgende Vergleiche gebildet:

- Wert zum Zeitpunkt 60 Minuten – Wert zum Zeitpunkt 30 Minuten (Änderung der Werte nach 30 Minuten vs. Ausgangswert)
- Wert zum Zeitpunkt 90 Minuten – Wert zum Zeitpunkt 30 Minuten (Änderung der Werte nach 60 Minuten vs. Ausgangswert)

Um statistisch zu zeigen wie deutlich sich die miteinander verglichenen Versuchsgruppen unterscheiden, werden Überschreitungswahrscheinlichkeiten (p-Werte) berechnet. Es wird hier eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ angenommen. Bei einem $p \leq 0,05$ ist dann Signifikanz gegeben. Ab Seite 153 ff. werden die Mittelwerte der Messpunkte in Tabellenform abgegeben. Werte mit Signifikanz wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Die Lebergewichte werden vor und nach der Perfusion bestimmt und die Werte miteinander verglichen, während der Perfusion wird das Gewicht nicht bestimmt.

Die Ergebnisse werden in Tabellen und Grafiken dargestellt. Die Berechnung wird mit dem Programm SAS, Version 8 des SAS Institute Inc., Cary NY (1999) durchgeführt.

3.10 Computer und Programme

Als Textverarbeitungsprogramm wird MS WinWord^{®26} herangezogen. Zur Erstellung der Grafiken und Tabellen wird MS Excel^{®28} für Windows genutzt.

Die graphischen Darstellungen werden mit MS Powerpoint^{®28} erstellt.

²⁶ Microsoft Office, Windows 1995