

### III. Material und Methoden

#### III.1. Material

##### III.1.1. Versuchsaufbau des hämoperfundierte Schweineherzens – die Perfusionsapparatur

Die Modifizierung des Langendorff-Modells ermöglichten VON BAEYER et al. (1997) eine neue Methode zur Perfusion von isolierten Organen mit körperwarmen Vollblut – die Ex-vivo-Vollblut-Perfusion. Die in diesem Versuch verwendete Apparatur wurde 1998 von der Firma Mediport Biotechnik GmbH (12247 Berlin) entwickelt und als Projekt der EXPO 2000 in der Region Berlin/Brandenburg, Focus Mediport, präsentiert. So liegen dieser Entwicklung gewonnene Erfahrungen an mehreren hundert Herzen zugrunde. Die Apparatur stellt einen extrakorporalen Kreislauf da und besteht aus drei miteinander verknüpften Teilkreisläufen:

1. Perfusionskreislauf
2. Dialysatkreislauf
3. Wärmekreislauf

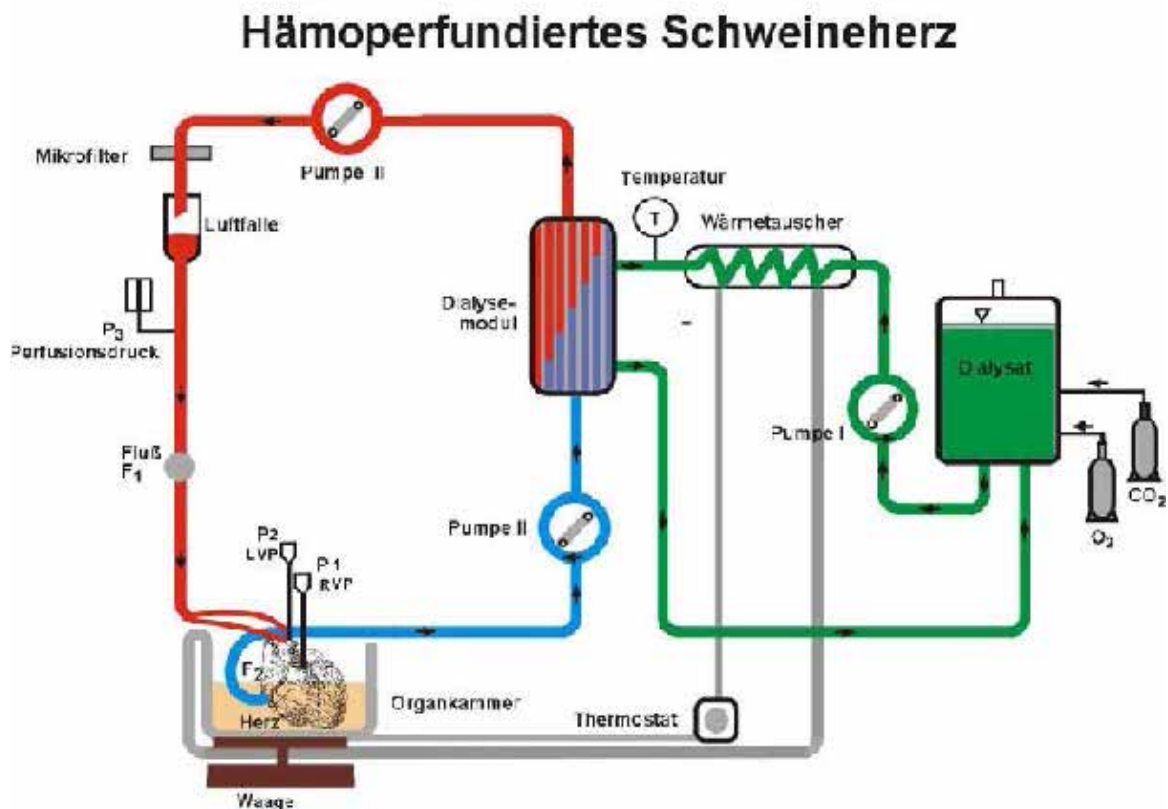


Abbildung 6 : Schematische Darstellung des **Perfusionsaufbaus**

### **III.1.1.1. Perfusionskreislauf**

Der Perfusionskreislauf wird durch zwei Rollenpumpen (Watson Marlow 505U) gesteuert. Die Rollenpumpe 2 fördert das sauerstoffreiche Blut-Perfusat-Gemisch vom Dialysemodul retrograd über die Aorta zum Herzen hin. Das aus dem Herzen in das Blutreservoir ablaufende venöse Blut wird über die Rollenpumpe 1 zurück zum Dialysemodul transportiert. So wird ein arterieller Schenkel (Rollenpumpe 2) und ein venöser Schenkel (Rollenpumpe 1) nachgeahmt. Zwischen der Rollenpumpe 2 und dem Herzen befindet sich eine Luftfalle (Dialyset: Gambro® medical line, arterial line: A-5.126-B8), die eine luftfreie Hämoperfusion garantiert. Das Blut-Perfusat-Reservoir, ein doppelwandiger Plexiglaszylinder fängt das venöse Hämoperfusat des Herzens auf. Eine computergesteuerte Waage (Sartorius PT6, Sartorius AG, Göttingen) sichert, dass Zu- und Abfluß genau geregelt wird, um einer Ödembildung entgegen zu wirken. Das Hämoperfusat umfasst ein Volumen von 1,5 l (1000 ml Blut + 500 ml Perfusat). Ein Manometer, welches am arteriellen Schenkel installiert wurde, misst den Perfusionsdruck, welcher sich zwischen 80-120 mmHg (10,64-15,96 kPa) befinden sollte. Der Perfusionsdruck kann durch die Einstellung der Drehzahl der Rollenpumpen reguliert werden.

### **III.1.1.2. Dialysatkreislauf**

Der Dialysatkreislauf besteht aus dem Dialysatreservoir (Plexiglaszylinder mit 4 Liter Füllvolumen) und dem Dialysemodul ( Hemoflow F7-Fresenius Polysulfone® , UF 6,4, Fa. Fresenius Medical Care AG, 61343 Bad Homburg). Im Reservoir befinden sich 3,5 l Dialysat, welches permanent mit Sauerstoff begast wird. Durch die Anreicherung mit Sauerstoff wird im arteriellen Schenkel des Blutkreislaufs ein Sauerstoffpartialdruck von über 400 mmHg (53,2 kPa) erreicht. Dieser erhöhte Wert entspricht den in der Literatur mitgeteilten Werten bei der zellfreien Perfusion. Auch damit soll den Folgen der ischämischen Organschädigung entgegengewirkt werden (VON BAEYER et al.1997). Eine Kreiselpumpe (Heidolph Typ) befördert das Dialysat aus dem Reservoir in das Dialysemodul und wieder zurück. Im Dialysemodul befinden sich Kapillaren. Blut und Dialysat kommen hierbei nach dem Gegenstromprinzip nur indirekt miteinander in Kontakt. Dabei kommt es zum Stoffaustausch aufgrund des herrschenden Konzentrationsgefälles. Glukose, Elektrolyte und Pyruvat werden vom Dialysat an das Blut abgegeben. Abbauprodukte werden vom Dialysat aufgenommen

und in das Reservoir transportiert. Die Flussrate im Dialysatkreislauf beträgt 4-5 Liter pro Minute.

### **III.1.1.3. Wärmekreislauf**

Ein Warmwasserbad (Integralbad Haake P5, Fa. Haake, 76227 Karlsruhe) sorgt für eine konstante Temperierung des Dialysates. Dieses geschieht durch eine integrierte Pumpe (Haake C1, Fa. Haake), welche das warme Wasser durch einen Metallstab im Dialysereservoir transportiert (Prinzip eines Heizstabes). Die Temperatur im Blutkreislauf misst konstant 38° Celsius. Im Blutreservoir befindet sich permanent ein Thermometer zur Kontrolle und Einhaltung von 38° Celsius des Blut-Perfusat-Gemisches. Um ein Auskühlen der Herzen zu verhindern, wurde eine Infrarot-Glühbirne angebracht.

### **III.1.2. Messverfahren**

#### **III.1.2.1. Datenaufzeichnung und Software**

Das Programm Cordat II (Triton Technology, Inc., San Diego, USA) speichert die verschiedenen messbaren Parameter der mechanischen Herzfunktion. Das Programm wurde speziell für kardiovaskuläre Versuche an Tierorganen entwickelt. Folgende Parameter werden in der Versuchsserie aufgezeichnet:

- Herzfrequenz (HR)
- Koronarer Blutfluß (CBF)
- linker Ventrikeldruck in der Systole ( $LVP_{max}$ )
- linker Ventrikeldruck in der Diastole (LVEDP)
- entwickelter linker Ventrikeldruck ( $LVP_{dev}$ )
- Druckänderung/Zeitverlauf ( $dP/dt_{max}$ )
- intramyokardialer Druck (IMP) – systolisch / diastolisch / entwickelter Druck
- Wanddickenänderung (Wth) - % / max. / min.
- Wanddicken-Druck-Schleife (loop)

Das Programm Cordat II speichert die Parameter in Excel-Tabellen ab.

### **III.1.3. Funktionsparameter**

#### **III.1.3.1. Ventrikeldruckmessung**

Die Messung des intraventrikulären Druckes (LVP/LVEDP) der isovolumetrischen Herzen erfolgt über ein Tipmanometer (Millar Catheter Transducers, Micro-Tip, Modell SPC-470, Houston, Texas, USA). Dieses Tipmanometer befindet sich in einem flüssigkeitsgefüllten Latexballon. Die Latexballon-Katheter werden jeweils im rechten und linken Ventrikel platziert. Der linke Ballon-Katheter wird durch den Truncus pulmonalis und der rechte Katheter durch die Vena cava in die jeweiligen Ventrikel hervorgeschoben. Der Ballon-Katheter wird mit Aqua dest. gefüllt, so dass er Kontakt zum Ventrikelmyokard hat. Dabei ist auf eine korrekte Lage der Katheter im Ventrikel zu achten. Anschließend wird er mit einem Einzelheft am Myokard fixiert. Die Aufzeichnung der Daten erfolgt rechnergestützt über das Software-Programm Cordat II.

#### **III.1.3.2. Intramyokardialer Wanddruck**

Die Messung erfolgt mit einem Mikrotip-Manometer (Millar Catheter Transducers, Micro-Tip, Modell SPC-320,2F; Houston, Texas, USA). Es wird der intramyokardiale Druck (IMP) in der Systole und Diastole gemessen, sowie der entwickelte Druck jeweils in der ischämischen Region (IMP1) und in der nicht ischämischen Hinterwand des linken Ventrikels (IMP2). Dazu wird die Sonde in das mittlere Myokard im Versorgungsgebiet des RIVA (IMP1) und in die nicht ischämische Kontrollregion (IMP2) eingebracht.

#### **III.1.3.3. Wanddickenänderung**

Die Änderung der Wanddicke in der Systole und Diastole zeigt die regionale Herzfunktion an. Sie wird während des Versuchsverlaufs mit einem Sonomicrometer und dem Messgerät System-6 von Triton (San Diego, USA) ermittelt. Dazu werden zwei sich gegenüberliegende Ultraschallkristalle ins Myokard, epikardial und subendokardial, gesetzt. Die Änderung der Entfernung der Kristalle von einander in der Systole und Diastole wird mit einem Zwei-Strahl-Oszilloskop (RFT Ty EO213, Chemnitz, BRD) aufgezeichnet. Die ermittelten Werte werden im Programm Cordat II gespeichert und in eine Wanddicken-Druck-Schleife (loops),

aus IMP und Wanddickenänderung, umgerechnet. Es wird die maximale, minimale Wanddicke und die prozentuale Änderung der Wanddicke gemessen. Die prozentuale Wanddickenänderung wird aus dem Verhältnis systolische Wanddicke : enddiastolische Wanddicke multipliziert mit 100 berechnet. Die Sonden zur Erfassung der Messwerte (Impulse) werden jeweils in das Myokard des Versorgungsgebiet des RIVA gesetzt (Wth1) und in das Myokard (Wth2) der nicht ischämischen Kontrollregion.

#### **III.1.3.4. Flußmessung**

Der Blutfluß wird ultraschallgestützt über das Gerät Transonic T206 (Transit Time Ultraschall Flowmeter) erfasst und gibt die Menge Blut an die pro Zeiteinheit (ml/min) durch das Organ fließt.

#### **III.1.3.5. Perfusionsdruck**

Der Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure, CPP) wird über ein Manometer (Fa. Erka, Bad Tölz, BRD) kontrolliert und registriert. Es wurde im arteriellen Schenkel des Perfusionskreislaufs angebracht. Der Perfusionsdruck kann entsprechend über die Förderleistung der Pumpen reguliert werden. Während der Herzperfusion sollte sich der Druck zwischen 80-120 mmHg (10,64-15,96 kPa) bewegen.

#### **III.1.3.6. Blutgasanalyse**

Die Analyse der Blutgasparameter erfolgen am Radiometer ABL<sup>TM</sup> 505 (Firma Radiometer Copenhagen, Dänemark). Es wurden der Sauerstoff-Partialdruck (pO<sub>2</sub>), der Kohlendioxid-Partialdruck (pCO<sub>2</sub>), der pH-Wert und Kalium gemessen. Die Proben wurden zu Beginn der Perfusion, nach 20 min, 40 min und 60 min entnommen und unmittelbar nach der jeweiligen Entnahme bestimmt.

### **III.1.3.7. Messung des pH-Wertes**

Der aktuelle pH-Wert des Blut-Dialysatgemisches wird mit einer speziellen pH-Sonde (HANNA instruments, HI 8314, membrane pH meter, Deutschland GmbH, 77694 Kehl am Rhein) ermittelt. Bei Bedarf erfolgt eine pH-Wert-Korrektur mit Natriumbicarbonat, so dass sich der pH-Wert im physiologischen Bereich von ca. 7,38- 7,42 bewegt. Vor Beginn des Versuchs muß die pH-Sonde mittels spezieller Eichlösungen kalibriert werden. Die Messsonde des pH-Meters liegt direkt im Blut-Dialysat-Reservoir.

### **III.1.4. Defibrillator**

Ein elektrischer Defibrillator (Hellige Servocard, DC-Defibrillator, Nr. 216 071) wurde mit 10-40 Joule für eine erfolgreiche Reanimation der Herzen eingesetzt. Es waren zwischen zwei und 10 Defibrillationen notwendig bis die Herzen einen Sinusrhythmus erreichten.

### **III.1.5. EKG-Ableitung**

Zur Überwachung der Herzfunktion erfolgte die EKG-Aufzeichnung über ein bipolares Standard-EKG (Software Cardiovit AT-104 PC, Schiller AG). Die EKG- Elektroden werden am Herzen befestigt. Eine Elektrode wird am rechten Herzohr befestigt und ein Elektrokatheter ins linke Cavum der Kammer vorgeschoben und ebenfalls fixiert.



Abbildung 7 : Versuchsaufbau isoliert hämoperfundiertes Schweineherz

### III.1.6. Verwendete Lösungen

#### III.1.6.1. Dialysatlösung

Zur Perfusion der isolierten Schweineherzen wird eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung nach MODERSOHN et al. (1997) verwendet. Die Lösung wird im eigenen Labor vor jedem Versuch frisch hergestellt und im Kühlschrank gelagert.

Substanz	Perfusionslsg. (Konzentration)	Transportlsg. (Konzentration)	Hersteller
NaCl	128 mmol	128 mmol	Sodium chloride, Merck, Darmstadt
KCl	2,3 mmol	3,6 mmol	Potassium chloride, RdH Laborchemikalien, Seelze
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol	25 mmol	Sodium hydrogencarbonat, U-LAB-A, Falkensee
MgSO <sub>4</sub>	0,6 mmol	0,6 mmol	Magnesium sulfate heptahydrate, Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mmol	1,25 mmol	Calcium chloride dihydrat, Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 (K)mmol	1,3 (K)mmol	di-Potassium hydrogen phosphate, RdH Laborchemikalien, Seelze
Glucose	11,2 mmol	11,2 mmol	D(+)-Glucose, Merck, Darmstadt
Insulin	10 I.E.	10 I.E.	Insuman Rapid <sup>®</sup> Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt a.Main
Heparin	2000 I.E./l	2000 I.E./l	Liquemin <sup>®</sup> N 25.000, Hoffmann-La Roche, Grenzach Whylen
BDM	-	30 mmol	2,3-Butadione monoxime, Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 1 : **Verwendete Substanzen** mit Konzentrations- und Herstellerangaben

#### III.1.6.2. Herstellung der Dialysatlösung

3 Liter aqua dest. plus 500 ml Stammlösung I plus 10 g Glucose, 50 I.E. Insulin (Insuman<sup>®</sup> Rapid). Für die Transportlösung/Kardioplegielösung werden 15 g BDM (30 mMol/L) zugesetzt. Substanzen gut lösen lassen, dann 500 ml Stammlösung II hinzufügen und auf 5 Liter mit Aqua dest. auffüllen. Die Transport-/Kardioplegielösung wird vor Anwendung auf 4° C gekühlt und ca. 20 Minuten mit 100 %igen medizinischem Sauerstoff begast.



### **III.1.6.3. Kardioplegielösung**

Für die Kardioplegielösung ist zu beachten, dass der KCL-Gehalt in der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung erhöht,  $\text{CaCl}_2$  auf die Hälfte reduziert ist und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ganz fehlt, aber 2,3-Butandion-Monoxim (BDM) zugesetzt wird (MODERSOHN et al.1997). BDM verbessert die Ischämietoleranz des Myokards. Die Kardioplegie-Lösung wird auf 4° Celsius heruntergekühlt. Nach Untersuchungen ist die tiefe Hypothermie – besonders in Kombination mit einer membranstabilisierenden Kardioplegie, eine ausgezeichnete Methode zur Verlängerung der tolerierten Ischämiedauer (KÜBLER et al. 1966). Durch die niedrige Temperatur wird die metabolische Aktivität reduziert (BUCKBERG 1987).

### **III.1.7. Blutaufbereitung**

Das gewonnene Eigenblut vom Organspendertier wird von den Leukozyten getrennt. Da Leukozyten in postischämischen Myokard akkumulieren und aktivierte neutrophile Leukozyten Mediatoren ausschütten, welche die Zellintegrität des Myokards stören (WESTLIN und MULLANE 1989) und für die Entwicklung postischämischer Schäden verantwortlich sind (SHERIDAN et al.1991). Das Blut wird dazu mit einem hocheffizienten Filter PALL-RC 400 KLE (PALL GmbH Biomedizin, 63303 Dreieich, BRD) gefiltert. Es werden außer Leukozyten auch Thrombozyten und andere Mikroaggregate aus dem Vollblut entfernt. Als Blutgerinnungshemmer wird Heparin verwendet. Es wird in Form einer handelsüblichen Injektionslösung angewendet. Pro Ampulle sind in 5 ml wässriger Suspension Liquemin® N 25 000 (Wirkstoff: Heparin-Natrium 25 000 IE, aus Schweinemukosa), Fa.Roche, sowie 50 mg Benzylalkohol als antimikrobielles Konservierungsmittel enthalten.

## **III.2. Methode der Präparation**

Die Herzen entstammen von insgesamt 28 Schweinen. Die Organgewinnung fand auf dem Schlachthof in Eberswalde (Eberswalder Fleischwarenfabrik, 16230 Britz) statt und im Tier-OP der tierexperimentellen Abteilung der Charité (Schumannstr. 20/21, 10098 Berlin) bzw. der tierexperimentellen Einrichtung Campus Virchow-Klinikum (Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin). Die aus dem Tier-OP stammenden Herzen wurden am Ende eines anderen Tierversuches entnommen. Diese Organentnahmen sind nicht genehmigungspflichtig.

Sechs Herzen werden als Kontrollherzen verwendet und 10 Herzen als Versuchsherzen. Fünf Herzen wurden aufgrund von nicht beeinflussbaren Herzarrhythmien bzw. Herzstillstandes von der Beurteilung ausgeschlossen. Fünf weitere Herzen waren entweder nicht zu reanimieren oder endeten als „Stone Heart“. Bei zwei Herzen musste aufgrund eines Aortenabrisses der Versuch abgebrochen werden. Die Schweine aus dem Tier-OP sind ausschließlich gesunde kastrierte männliche Tiere mit einem Lebendgewicht von 26,8 kg bis 39 kg. Das durchschnittliche Gewicht der Schweine beträgt 29 kg. Das Gewicht der Schlachthofschweine beträgt zwischen 50 und 120 kg. Es handelte sich um männliche sowie weibliche Tiere. Die Herzgewichte wurden vor und nach der Perfusion bestimmt und miteinander verglichen.

### **III.2.1. Organgewinnung der isolierten Herzen**

#### **III.2.1.1. Herzentnahme unter Schlachthofbedingungen**

Nach der erfolgten Schlacht tieruntersuchung (FIHV, Anl.1, Kap.I) durch den zuständigen Veterinär werden die Schweine durch einen Elektroschock (bei 220 Volt, 8 Sekunden) betäubt. Die Tötung der Tiere erfolgt durch das Ausbluten durch eine Stichinzision der Vena cava cranialis. Das abfließende Blut wird in einer sterilen Metallschüssel mit einem Zusatz von 3,2 % igen Citrat (15ml/l Blut) zur Blutgerinnungshemmung, unter leichtem Rühren mittels Glasstab aufgefangen. Das Blut wird sofort in Kunststoffflaschen umgefüllt, um den schädlichen Luftkontakt möglichst gering zu halten und mit 10.000 I.E. pro Liter Blut heparinisiert (Liquemin® 5000, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach Whylen) und im Eis gelagert. Unter normalen Schlachtbedingungen werden die Tiere anschließend gemäß der Fleischhygieneverordnung (FIHV, Anl.2, Kap. III, 2.2.1) gebrüht und entborstet. Um die

warme Ischämiezeit (Zeitpunkt der Entblutung bis zur Kardioplegie) so gering wie möglich zu halten, wurde auf den Brühvorgang verzichtet. Tiere die unmittelbar nach dem Schlachten nicht entborstet werden können, müssen nach der Fleischhygieneverordnung (FIHV, Anl.2, Kap.III,2.2) enthäutet werden. Die Kosten für die nicht mehr verwendbare Haut der Schweine mussten erstattet werden. Jedoch konnten die Tiere nach einer Organentnahme der Lebensmittelherstellung zugeführt werden, da diese geringfügige Änderung im Schlachtablauf keinen Einfluß auf die Fleischqualität hatte.

Nach der vollständigen Entblutung wurde der Thorax eröffnet. Durch einen Schnitt in der Medianen konnte das Sternum freigelegt werden. Es erfolgte die Sternotomie mit einer Knochensäge. Durch den Einsatz eines Thoraxspanners wird das Herz zur Entnahme zugänglich gemacht. Zunächst wird das Perikard vorsichtig eröffnet. Anschließend erfolgte die zügige Exzision des Herzens, indem die Aorta, die Arteria pulmonalis, die Hohlvenen und Lungenvenen durchtrennt wurden. Die Koronarien des Herzens wurden sofort kanüliert und mit kalter BDM-Kardioplegie-Lösung luftblasenfrei gespült. Zunächst wurde die linke und dann die rechte Koronararterie mehrmals mit 50 ml kalter Kardioplegie-Lösung durchspült.

Der Transport des Herzens erfolgte in eisgekühlter Kardioplegie-Lösung in einem Organtransportgefäß. Das gewonnene Organ und das Vollblut wurden auf Eis gekühlt zügig zum Labor transportiert.

### **III.2.1.2. Herzentnahme im Tier-OP**

#### **III.2.1.2.1 Vorbereitung zur Herzentnahme im Tier-OP**

Zur in-situ-Perfusion werden ca. 1 Liter Kardioplegie-Lösung benötigt. Die auf 4° C gekühlte Kardioplegie-Lösung mit BDM-Zusatz wird in einer Perfusionsflasche mit einem Perfusionsbesteck vorbereitet. Es ist auf eine absolut luftblasenfreie Lösung zu achten. Über ein Manometer wird der Perfusionsdruck überwacht. Ein Transportbehälter gefüllt mit 4-8° C kalter Kardioplegie-Lösung und 50ml-Perfusor-Spritzen mit speziellen Koronarkathetern werden bereitgehalten. Im Falle einer nicht optimal durchgeführten in-situ-Perfusion, das heißt die Koronarien stellen sich nicht klar auf der Herzoberfläche dar, müssen diese nochmals kanüliert und luftblasenfrei perfundiert werden.

### **III.2.1.2.2. Anästhesie des Schweines**

Die Prämedikation der nüchternen Tiere erfolgt intramuskulär mit 200mg/10kg Körpergewicht (KG) Ursotamin® (Ketanest), 2,5mg/10kg KG Dehydrobenzperidol und 0,25mg/10kg KG Atropin. Zur Einleitung bekommt das Schwein intravenös in die Ohrvene mittels Butterfly 50mg/10kg KG Ursotamin®, 1,25-2,5mg/10kg KG Dehydrobenzperidol, 0,05mg/10kg KG Fentanyl als Schmerzmittel und zur Muskelrelaxation 1mg/10kg KG Pancuronium injiziert. Anschließend wird es in Rückenlage ausgebunden und intubiert. Die Intubationsnarkose erfolgt mit einem Lachgas-Sauerstoffgemisch von 3:1,5 l/min. Zur Blutgewinnung wird das Schwein intravenös heparinisiert. Nun beginnt die Präparation der Vena jugularis externa, indem ein lateraler Halsschnitt entlang des Musculus sternocleidomastoideus durchgeführt wird. Durch Einbinden eines Katheters in die Vena jugularis externa kann die weitere notwendige intravenöse Applikation von Medikamenten stattfinden. Nach den erfolgten in-vivo Messreihen am Schwein durch eine andere Arbeitsgruppe, kann mit der Präparation der Arteria carotis communis zur Blutgewinnung begonnen werden. Nach Katheterisierung der Arterie wird ein Liter Blut für den Versuch gewonnen und in einer Kunststoffflasche mit einem Zusatz von 5000 I.E. Heparin aufgefangen.

### **III.2.1.2.3. In-Situ-Perfusion und Herzentnahme**

Zur Eröffnung des Thorax wird einen Zentimeter links der Medianen ein Hautschnitt durchgeführt. Der Schnitt wird durch die Unterhaut und Muskulatur bis auf das Sternum fortgesetzt. Unter Anwendung des Thermokauters können kleinere Blutungen vermieden werden. Nach dem Freilegen des Sternums wird durch das Zwerchfell am Cartilago xyphoidea mit einer großen Klemme mit einem Tupfer versehen, in das Mediastinum stumpf vorgestoßen, um den Herzbeutel vom Brustfell zu lösen. Anschließend wird mit einer Knochenschere (oder einer Zange) die Rippen-Rippenknorpel-Verbindung im knorpeligen Anteil durchtrennt. Bei älteren Schweinen bei denen die Knorpel bereits verknöchert sind, ist das Eröffnen des Thorax mit Hammer und Meißel zu empfehlen. Beim Durchtrennen der vorderen Thoraxapparatur ist auf die dort liegenden Gefäßstrukturen zu achten (Truncus costocervicalis, Arteria subclavia sinistra, Arteria axillaris, Truncus brachiocephalicus). Mit einem Rippensperrer nach Finochietto verschafft man sich eine möglichst gute Übersicht über

das Herz und die Gefäßstrukturen im Thorax. Der Herzbeutel wird stumpf eröffnet. Zunächst wird die Adventitia der Aorta durch einen kleinen Schnitt eröffnet, um ein leichteres Vordringen der Perfusionsnadel in das Lumen der Aorta zu ermöglichen. Die Perfusionsnadel wird in die Aorta vorgestoßen und diese mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert. Dann werden die Arteria subclavia sinistra, Truncus brachiocephalicus und die Aorta thoracica abgeklemmt. Nun ist ein schnelles Vorgehen essentiell, um die warme Ischämiezeit möglichst gering zu halten. Der Perfusionsschlauch wird an die Nadel angeschlossen und die luftblasenfreie Perfusion beginnt mit einem Perfusionsdruck von 80-100 mmHg (10,64-13,30 kPa). Gleichzeitig muß die Vena cava caudalis eröffnet werden, damit das Herz druckentlastet wird und das Blut-Kardioplegie-Gemisch ungehindert abfließen kann. Mit einem Absauggerät wird die Flüssigkeit aufgefangen um eine gute Übersicht im Thorax zu behalten. Die Perfusion sollte zügig aber mit konstantem Druck erfolgen, so dass die mechanische und elektromechanische Aktivität bereits nach einigen Minuten komplett geblockt wird. Dann erfolgt die Excision des Herzens. Die Herzkonsistenz muß nun weich sein und die Koronargefäße sollten auf der Herzoberfläche klar erscheinen. Wenn die Gefäße noch Blut enthalten, werden sie mit einem speziell hergestellten Koronarkatheter kanüliert und durchspült. Das Herz wird in einem mit kalter Kardioplegie (4-8°C) gefülltem Gefäß transportiert. Der Thorax des Tieres ist mit einer fortlaufenden Naht wieder zu verschließen.

### **III.2.2. Präparation und Vorbereitung der entnommenen Herzen**

Vor Beginn der Präparation erfolgt die Beurteilung der Qualität der explantierten Herzen. Die Herzoberfläche sollte unverletzt und frei von Verwachsungen und Fibrinauflagerungen sein. Die Koronargefäße müssen frei von Blut sein und sich klar auf der Herzoberfläche darstellen. Die Herzmuskulatur muß eine weiche Konsistenz aufweisen. Herzen, die sich nach der Kardioplegie in einem erhöhten Kontraktionszustand befanden – Entwicklung des sogenannten „Stone Heart“ – wurden von der Perfusion ausgeschlossen. Der Mechanismus des „Stone Heart“-Syndroms beruht auf dem Abfall des ATP-Gehaltes auf einem kritischen Level, so dass die Aktin-Myosin-Komplexe eine starke Interaktion zwischen den Proteinen der dicken und dünnen Filamenten ausbilden – sogenannte „Rigor Complexes“ (KATZ et al. 1977). Vor dem Versuch wird jedes Herz gewogen. Die Gewichte der einzelnen Herzen werden vor und nach den Versuchen registriert. Zunächst wird das überflüssige Fett entfernt, besonders im Bereich der Aorta. Die Aorta wird vom Truncus pulmonalis stumpf getrennt. Es

ist darauf zu achten, dass der Aortenstumpf möglichst lang erhalten bleibt, damit eine Fixierung des Perfusionskonus möglich ist, um die Koronarien retrograd zu perfundieren. Für die Durchführung einer Okklusion des RIVA, wird das Gefäß der A. cor. sin. im oberen Drittel des Herzens freipräpariert und ein Faden der Stärke 4,0 metric wird unter dem Gefäß hergeführt. Die Fadenenden werden gemeinsam durch ein Plastikröhrchen durchgezogen und mit einer Moskitoklemme fixiert. In die Aorta wird ein Konus zur retrograden Perfusion der Koronarien platziert und mit einem Kabelbinder befestigt. Es ist darauf zu achten, dass bei diesem Vorgang die Aorta nicht geschädigt wird. Während des Versuches sichtbar werdende Sickerblutungen werden ligiert. In das Lumen beider Ventrikel wird jeweils ein flüssigkeitsgefüllter Latexballon zur Ventrikeldruckmessung eingesetzt. Durch den Truncus pulmonales über die Mitralklappe wird ein Ballonkatheter in die linke Kammer vorgeschoben und ein zweiter Katheter durch die Vena cava über die Tricuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Nach Prüfung der korrekten Lage werden diese mit Aqua dest. gefüllt. Jeweils ein Einzelheft fixiert diese an der Herzbasis. Die Sonden zur Messung des Intramyokardialen Druckes und der Wanddickenänderung werden jeweils im ischämischen Ventrikelgebiet (IMP1) / (Wth1) und nicht ischämischen Kontrollareal (IMP2) / (Wth2) ins Myokard eingesetzt und gut fixiert.

#### **III.2.3. Vorbereitung der Perfusionsapparatur**

Das einem Blutkreislauf nachgeahmte Schlauchsystem wird vor Beginn des Versuches auf Dichtigkeit geprüft. Dazu wird der gesamte Kreislauf mit Aqua dest. durchspült, was ebenfalls eine reinigende Funktion hat. Anschließend wird das Aqua dest. entfernt und das Dialysereservoir mit 3,5 l Tyrode-Lösung gefüllt. Die permanente Begasung des Reservoirs mit medizinischem Sauerstoff sorgt für einen  $pO_2$  von ca. 400 mmHg (53,2 kPa) im arteriellen Schenkel des Blutkreislaufes. Das Wasserbad wird temperiert und ein Thermometer im Blutreservoir platziert. Die Temperatur misst während des Versuchs 38° Celsius (Normaltemperatur Schwein 38-39° C). Ein pH-Meter im Blutreservoir kontrolliert den aktuellen pH-Wert. Der pH-Wert sollte zwischen 7,38 und 7,42 betragen und wird bei Bedarf korrigiert. In das Blutreservoir werden das heparinisierte Blut von 1 Liter Volumen mit 0,5 l Tyrode-Lösung gefüllt. Die Waage des Blutreservoirs wird auf 1,5 l geeicht. Die Regeltechnik der Pumpen sorgen für ein konstantes Volumen im Blutreservoir. Im gesamten

Kreislauf befinden sich nun insgesamt 5 Liter Flüssigkeit. Das Programm Cordat II wird gestartet und es erfolgt die Validierung der einzelnen Parameter.

#### **III.2.4. Technik der retrograden Perfusion und Anschluß des Herzens an die Perfusionsapparatur**

In diesem Versuch wird das Herz retrograd über die Aorta perfundiert. Dazu wird ein Konus in die Aorta vorgeschoben, ohne dass die Abgänge der Koronararterien verschlossen werden. Ein Kabelbinder verbindet Aorta und Konus und gewährleistet eine dichte und druckstabile Verbindung. In anderen Versuchen von KIMOSE et al.(1990) wurden die Herzen über die linke A. subclavia perfundiert, während die A. brachiocephalica abgebunden und der distale Teil des Aortenbogens abgeklemmt wurde. AST (2000) perfundierte Herzen direkt über die Koronargefäße, indem spezielle Katheter in die A.cor.dextra sowie in den Ramus circumflexus (RCX) und Ramus interventricularis paraconalis (RIVA) der A. cor. sinistra eingebunden wurden. Der Anschluß des Herzens an das System muß luftblasenfrei geschehen. Zu Beginn wird mit einem geringen Perfusionsdruck von maximal 50 mmHg (6,65 kPa) perfundiert. In den ersten Minuten wird das aus dem Herzen abfließende Blut gesondert aufgefangen. So erfolgt eine Auswaschung der Kardioplegie-Lösung. Durch langsame aber stetige Erhöhung des Perfusionsdruckes zeigt sich bereits nach kurzer Zeit ein Vorhofflimmern bis hin zum Kammerflimmern. Der Perfusionsdruck bewegt sich nun zwischen 80 und 120 mmHg (Referenzbereich nach SCHEUNERT UND TRAUTMANN 1987). Währenddessen wird das Herz über das Blutreservoir gehängt. Das nun passiv abfließende Blut wird über die Rollpumpe1 zum Dialysem modul transportiert. Die Katheter zur Ventrikeldruckmessung, die Sonden zur Messung des intramyokardialen Druckes und der Wanddickenänderung werden an die entsprechenden Geräte angeschlossen. Die EKG-Elektroden werden am Herzen platziert. Kein Herz zeigte einen spontanen Sinusrhythmus und musste entsprechend defibriert werden.

#### **III.2.5. Reanimation der Herzen**

Nach ca. 5 Minuten Reperfusion wurde das Herz mit bis zu 10 Defibrillationen von 10-40 Joule reanimiert bis das Herz einen Sinusrhythmus erreichte. Die Reanimation wird durch

verschiedene Faktoren beeinflusst. Ein kritischer ATP-Gehalt sowie der pH-Wert können die Reanimation des Herzens negativ beeinflussen (BRETSCHEIDER et al. 1975). Bei Untersuchungen am isolierten Schweineherzen von KIMOSE et al.(1990) begann kein Herz im Sinusrhythmus an zu schlagen. Es wurden daher alle Herzen konsequent nach 10-minütiger Reperfusion defibrilliert. Zur Unterstützung der Reanimation werden in diesen Versuchen ca. 2 ml Arterenol® (Wirkstoff Norepinephrinhydrochlorid 1:1000, Fa. Hoechst AG) in einer Verdünnung von 1:10 mit isotonischer Kochsalzlösung, verabreicht. Bei anhaltendem Kammerflimmern wurde Lidocain (Xylocain® 5%ig) in einer Verdünnung von 1:10 appliziert, um ventrikuläre Tachykardien und Extrasystolien zu vermeiden. Im Allgemeinen erreichten alle im Versuch verwendeten Herzen nach ca.15 - 20 Minuten eine regelmäßige Herzaktivität.

#### **III.2.6. Versuchsdurchführung**

##### **III.2.6.1. Versuchsprotokoll I**

Die Kontrollgruppe besteht aus 6 Herzen. Die Perfusion dieser Herzen dient zur Überprüfung der Stabilität des Perfusionsaufbaus und soll die experimentelle Brauchbarkeit der Organe im Anschluß eines Tierversuches darstellen. Die Bewertung erfolgte durch den Vergleich der Messwerte ausgewählter Versuchsparameter mit ihren physiologischen oder experimentell bestätigten Referenzwerten.

Nach einer initialen Anpassungsphase, in der die Adaptation des Herzens an die Perfusionsverhältnisse erfolgte, wurde die Messung von folgenden Parametern alle 10 Minuten aufgezeichnet: Herzfrequenz (HR), linker systolischer Ventrikeldruck ( $LVP_{max}$ ), linker enddiastolischer Ventrikeldruck (LVEDP), entwickelter Druck im zeitlichen Verlauf ( $dp/dt_{max}$ ), Perfusionsdruck (CPP) und koronarer Blutfluß (CBF). Arterielle Blutgasanalysen ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ , pH,  $K^+$ ) wurden zu Beginn, nach 20, 40 und 60 Minuten bestimmt. Die Perfusion dieser Herzen wurde insgesamt 60 Minuten durchgeführt.

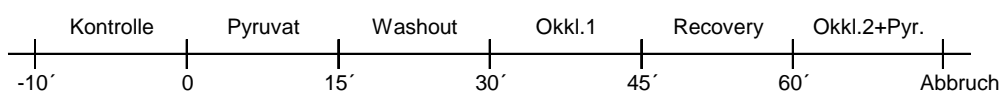


### III.2.6.2. Versuchsprotokoll II

Die Versuchsgruppe besteht aus 10 Herzen. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Stabilisierung der hämodynamischen Parameter, sowie die Äquilibration des pH-Wertes. Ausschlaggebende Parameter für den Beginn der Versuchsphase waren das Erreichen eines physiologischen Perfusionsdruckes von 80-120 mmHg bzw. 10,64-15,96 kPa und eines hämodynamischen und rhythmologisch stabilen Perfusionsverlaufes.

Nach der Erhebung der Daten in der Kontrollphase werden dem Perfusat zum Zeitpunkt 0 eine überphysiologische Konzentration von 5 mMol/l Pyruvat (Pyruvic Acid / Alpha-Ketopropionic acid, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim) zugesetzt. Die physiologische arterielle Konzentration von Pyruvat liegt zwischen 0,2 und 1,1 mMol/l (PANCHAL et al. 2000). Nach einer 15-minütigen Washout-Phase wird gewährleistet, daß keine Rückstände des Stoffwechselproduktes im Perfusionskreislauf vorhanden sind. Anschließend wurde eine Okklusion im RIVA für einen Zeitraum von 15 Minuten durchgeführt. Ziel ist es in einem definierten Versorgungsgebiet, speziell dem des linken Ventrikels eine Ischämie zu erzeugen. Nach Okklusion der Koronararterie kommt es zu einem enormen Anstieg des Perfusionsdruckes auf überphysiologische Werte von > 120 mmHg bzw. > 15,96 kPa. Der Perfusionsfluss musste anschließend manuell so reguliert werden, dass der vor der Okklusion registrierte Perfusionsdruck beibehalten wurde. Nach Aufhebung der Okklusion erfolgte eine 15-minütige Erholungsphase (Recovery). Während einer zweiten Okklusion im RIVA wurden 5 mMol/l Pyruvat dem Dialysat zugesetzt. Die Messwerte der globalen und lokalen mechanischen Funktion wurden fortlaufend über eine Recheneinheit (Software-Paket Cordat II) aufgezeichnet.

### III.2.6.3. Übersicht zum Versuchsverlauf



### III.2.7. Protokollierung von folgenden Parametern

- Herzfrequenz (HR)
- Linker systolischer Ventrikeldruck ( $LVP_{max}$ )
- Linker enddiastolischer Ventrikeldruck (LVEDP)
- Linker entwickelter Ventrikeldruck ( $LVP_{dev}$ )
- Entwickelter Druck im zeitlichen Verlauf ( $dp/dt_{max}$ )
- Intramyokardialer Druck im ischämischen bzw. nicht ischämischen Gebiet ( $IMP1_{sys} / IMP2_{sys}$  und  $IMP1_{dev} / IMP2_{dev}$ )
- Wanddickenänderung im ischämischen bzw. nicht ischämischen Myokard ( $Wth1\% / Wth2\%$ )
- Perfusionsdruck (CPP)
- Koronarer Blutfluß (CBF)
- pH-Wert (pH)
- Temperatur (T)

Parameter	Referenzbereich	Literatur, Bemerkungen
Herzfrequenz (HF)	70-90/min	SCHEUNERT und TRAUTMANN 1987-Referenzwerte Schwein
Organfluss (CBF/100g)	60-120 ml*min <sup>-1</sup> *100g <sup>-1</sup>	SCHEUNERT und TRAUTMANN 1987- Referenzwerte
Perfusionsdruck (CPP)	80-120 mmHg (10,64-15,96 kPa)	SCHEUNERT und TRAUTMANN 1987- Referenzwerte
p <sub>H</sub> arteriell	7,38-7,42	SMITH et al. 1997- Referenzwerte
pO <sub>2</sub> arteriell	100-200 mmHg (13,3-26,6 kPa)	SMITH et al. 1997- Referenzwert Schwein
pCO <sub>2</sub> arteriell	40 ± 4 mmHg (5,32±0,53 kPa)	SMITH et al. 1997- Referenzbereich Schwein
Gesamt-Hämoglobin (Hb)	9-13 g/dl (0,9-1,3 g/l)	FRASER 1991-Referenzwerte Schwein

Tabelle 2 : **Qualitätsparameter und Referenzwerte** für das normotherm hämoperfundierte isolierte Schweineherz nach AST (2000).

### **III.2.8. Statistik**

Es werden die Kontrollwerte mit den gemessenen Werten unter Pyruvatzusatz des präischämischen Intervalls untereinander verglichen, sowie Okklusion 1 mit Okklusion 2 unter Pyruvatzusatz. Um statistisch zu zeigen wie deutlich sich die miteinander verglichenen Versuchsphasen unterscheiden, werden Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) berechnet. Dazu wurde der Wilcoxon-Test in SPSS 11.0 für Windows angewendet. Der Wilcoxon-Test ist der übliche Test zum nichtparametrischen Vergleich zweier abhängiger Stichproben. Er basiert auf einer Rangreihe der absoluten Wertepaardifferenzen. Zwei Stichproben sind voneinander abhängig, wenn jedem Wert der Stichprobe auf sinnvolle und eindeutige Weise genau ein Wert der anderen Stichprobe zugeordnet werden kann. Die Messwerte zu den verschiedenen Messzeitpunkten, wie in diesen Versuchen, führen dann zu abhängigen Stichproben. Nichtparametrische Tests werden überall dort angewandt, wo die Annahme der Normalverteilung nicht aufrechterhalten werden kann. Statistisch signifikante Ergebnisse ergeben einen Wahrscheinlichkeitswert (p-Wert)  $< 0,05$ .

Die graphische Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  standard error of mean (SEM) wurden mittels Balkendiagramm mit Excel 2000 erstellt. Die Liniendiagramme beinhalten die Einzelwerte der Messreihen und wurden ebenfalls unter Verwendung von Excel 2000 erstellt.

### **III.2.9. Verwendete Programme**

Es wurde zur Textverarbeitung Word 2000 und zur Auswertung der Ergebnisse Excel 2000 sowie SPSS Version 11.0 für Windows verwendet.