

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



- Arbeitsexemplar** – unterliegt dem Änderungsdienst
 Informationsexemplar – unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Inhalt	Seite
1 Zweck.....	2
2 Einsatzbereich.....	2
3 Messprinzip / Grundlagen.....	2
4 Einschlusskriterien.....	2
5 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material.....	3
5.1 Spendertiere.....	3
5.2 Zubehör Schlachthof.....	4
5.3 Perfusionsapparatur.....	5
6 Chemikalien und Material.....	5
6.1 Perfusat.....	6
6.2 Dialysat.....	7
7 Durchführung des Verfahrens.....	7
7.1 Vollblutgewinnung für die Extremitätenperfusion.....	7
7.2 Organgewinnung.....	8
7.3 Präparation der Rinderextremität.....	8
7.4 Vorbereitung der Perfusionsapparatur	9
7.5 Anschluss der Extremität an die Apparatur.....	10
7.6 Versuchsdurchführung.....	11
7.6.1 Probenentnahme.....	11
7.6.2 Richtwerte und Korrekturmaßnahmen.....	11
7.7 Gabe von Zusätzen bei 5h Perfusion.....	12
7.8 Datenerhebung.....	12

	erstellt	geprüft	geprüft (QS)	freigegeben
Abteilung	Labor	Prüfleiter	GLP-QS	Leiter der Prüfeinrichtung
Name		Dipl. Ing. K. Friedemann		Dr. M.J. Jacobs
Datum				
Unterschrift				
Dateiname	SOP_1-09_Rinderbeinperfusion_2004.odt			

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



1 Zweck

Diese Standardarbeitsanweisung (SOP) beschreibt die Anforderungen an die Spendertiere und den Vorgang der Organ- und Blutgewinnung sowie die Durchführung der normothermen Perfusion isolierter Vorderextremitäten von Rindern. Die SOP umfasst alle Tätigkeiten von der Gewinnung und Präparation der Extremitäten, Vorbereitung des Aufbaus, Anschluss des Organs an das System bis hin zum Erreichen stabiler hämodynamischer Bedingungen.

2 Einsatzbereich

Die isolierte Rinderextremität wird in der Grundlagenforschung eingesetzt.

3 Messprinzip / Grundlagen

Die verwendete Apparatur besteht aus einem Perfusat-, und einem Dialysatkreislauf. Die isolierte Rinderextremität wird nach entsprechender Präparation an den Perfusatkreislauf angeschlossen und mit einem Gemisch aus Erythrozyten, Albumin, Dialysat, Insulin unter normothermen Bedingungen perfundiert. Über ein Dialysem modul finden Gas- und Stoffaustausch mit dem Dialysatkreislauf statt. Die Erwärmung des Perfusates erfolgt über einen Heizkreislauf.

4 Einschlusskriterien

Die Extremität wird für einen Versuch eingesetzt, wenn nach der 1-stündigen Anpassungsphase der Perfusionsdruck zwischen 35 und 100 mmHg liegt. Der korrespondierende Perfusionsfluss wird entsprechend manuell geregelt (wenn nicht anders gefordert wird normalerweise 195ml/min eingestellt). Steigt der Druck im Verlauf der Untersuchung, bei dann gleichbleibendem Fluss, über 135 mmHg wird der Versuch abgebrochen.

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



5 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material

ABL™555	Radiometer Copenhagen®
OSM™3	Radiometer Copenhagen®
IKA Schüttler MTS 4	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Präzisionswaage	BP 610, LA 230 S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q® Biocel, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 400 R, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

5.1 Spendertiere

Die beschriebenen Anforderungen an die Spendertiere gelten für alle entnommenen Organe. Vor der Schlachtung werden die Tiere einer Schlachttieruntersuchung, geregelt in der Fleischhygieneverordnung (FLHV), unterzogen. Diese soll Störungen des Allgemeinbefindens und auf Mensch und Tier übertragbare Krankheiten ausschließen.

Für die Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere werden berücksichtigt:

- gleichmäßige Belastung der Vorderextremitäten
- gutes Allgemeinbefinden

Spenderspezies: Rind
Organlieferant: Fleischzentrum Lausitz, Kasel-Golzig
sowie weitere geeignete Schlachthöfe.

Voraussetzungen der Spendertiere:

Geschlecht: weiblich, im Ausnahmefall männlich
Klauen: keine makroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen vor Ort im Schlachthof

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



5.2 Zubehör Schlachthof

Das erforderliche Zubehör ist in der Checkliste CL_1-12_Extremität Rind sowie CL_1-01_Schlachthofkoffer aufgeführt. Das erforderliche Zubehör für die Blutgewinnung ist in der Checkliste CL_1-02_Blut aufgeführt.

Die Spüllösung setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 1 l Tomaejonin-Lösung Na 140 K 4
- 40 ml 5% Glucose
- 2 ml Heparin (= 10.000 I.E.) Liquemin N25000

Diese Bestandteile werden in einer 1l - Kunststoff-Flasche gemischt und im Anschluss für ca. 10 Minuten mit 100 NI/h med. O₂ begast, um einen pO₂ zwischen 500 und 600 mmHg zu erreichen (Überprüfung mittels BGA). Findet die Perfusion am selben Tag statt, reicht eine Begasung von 5 Minuten und ein resultierender pO₂ von 300 - 400 mmHg. Bis zum Transport in den Schlachthof wird die Lösung im Kühlschrank bei 4 bis 8 °C bzw. auf Eis gelagert, damit der Sauerstoffgehalt unverändert bleibt. Der Transport erfolgt gekühlt.

Im Schlachthof wird der Lösung 1 ml verdünnte Insulin-Lösung (= 0,8 I.E.) zugesetzt. Diese wird unmittelbar zuvor oder maximal am Vortag im Labor hergestellt und in einem Becher im Kühlschrank gelagert. Zum Transport wird die Lösung in eine Insulinspritze (1 ml) aufgezogen und mittels Klebeband an der jeweiligen Flasche befestigt.

Herstellen einer Insulinlösung mit 0,8 I.E./ml:

- 0,98 ml 0,9% NaCl
- Zugabe von 0,02 ml Insuman® Rapid (1 ml = 40 I.E.)
- Somit sind 0,8 I.E. in 1 ml Insulinlösung enthalten

Der Citratpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

66 mmol/l Tri-Natrium Zitrat (0,9705 g) und 44 mmol/l Zitronensäure (0,4623 g) werden in 50 ml Millipore oder Dest. Wasser durch kräftiges Schütteln gelöst. Der Puffer wird am Versuchstag frisch angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



5.3 Perfusionsapparatur

Perfusionsapparatur:	Standard-Perfusionssystem für isolierte Schweineextremitäten der Vitro-Tec Entwicklungs-GmbH
pH-Meter:	Greisinger, Regenstauf, Deutschland, (Kat.-Nr.: GMH 3530)
Sauerstoff-Flussmesser	Novodirect, Kehl/Rhein, Deutschland (Cat.-No.: A74035)
Kohlendioxid-Flussmesser:	Novodirect, Kehl/Rhein, Deutschland (Cat.-No.: A73995)
pH-Sonde / pt1000:	Novodirect, Kehl/Rhein, Deutschland (Cat.-No.: A86402)
Waage:	SARTORIUS, Göttingen, Deutschland (Kat.-Nr.: BL6)
Daten Interface:	SARTORIUS, Göttingen, Deutschland (Kat.-Nr.: YDO 01BL)
Thermostat:	HAAKE, Karlsruhe, Deutschland (Kat.-Nr.: 425-1821)
Rollenpumpen:	Watson-Marlow, Düsseldorf, Deutschland (Kat.-Nr.: 505AutoDrive 55 RPM/505U)
Kreiselpumpe:	EHEIM Modell 1250 (Kat.-Nr.: 1250 21 993)
Dialysat-Reservoir:	Vitro-Tec Entwicklungs-GmbH, Berlin, Deutschland
INFUS blutführendes System:	Baxter (modifiziert von Vitro-Tec Entwicklungs-GmbH)
Dialysem modul:	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland (Kat.-Nr.: Hemoflow F7, low flux)
Steuerungseinheit:	Vitro-Tec Entwicklungs-GmbH, Berlin, Deutschland
Daten-Abtaster HP Data Logger	Hewlett Packard, Böblingen, Deutschland Typ 34970A
Daten-Aufzeichnungs-Software:	Vitro-Tec Entwicklungs-GmbH, Berlin, Deutschland
PC mit serieller Schnittst., HP Bus:	Vela, Professional Line
Interface Karte:	National Instruments, München, Deutschland (Kat.-Nr.: 777385-01)

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



6 Chemikalien und Material

Calcium Braun 10 %	B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, Deutschland
Insuman® Rapid	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
Glucose 5 %	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland, Zul. Nr. 4999.99.99 oder
D(+)-Glucose	Serva, Heidelberg, Deutschland (Cat.No.22700)
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg, Deutschland, Best.Nr. 11930
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland, Kat.Nr.1.06400.5000
Kaliumchlorid	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland Kat.Nr. 529552
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland Kat.Nr. 1.06329.1000
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland Kat.Nr.1.02381.1000
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland Kat.Nr.1.05832.1000
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tomaejonin Na 140 K4	Delta Pharma, Zul.Nr. 5964.00.00
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland, Kat-Nr. 1.06446.1000
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland Kat.-Nr. 1.00244.0500
Heidelberger Verlängerung	MPL Medical-Produkte Lichtenberg GmbH, Germany, diameter 0,3 cm Art. Nr. 74.4305
Spritzenpumpenleitung	clinico, Bad Hersfeld, Germany, diameter 0,2 cm, Art. No. 78415000
Ernährungssonde	B. Braun Melsungen AG, Germany, diameter 0,15 cm, PZN 2197165
Venenkatheter	B. Braun Melsungen AG, Germany, diameter 0,08 cm, Art.-No. 438713/9

6.1 Perfusat

Das verwendete Perfusat ist ein Gemisch aus Erythrozyten und Dialysat .

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



6.2 Dialysat

Pro Aufbau wird folgendes als Dialysat benötigt:

Saurer Bestandteil: Bedarf 106 ml

NaCl = 210,7 g

KCl = 5,22 g

MgCl₂ x 6H₂O = 3,56 g

CaCl₂ x 2H₂O = 9,0 g

CH₃COOH = 6,31 g

auf 1000 ml mit Millipore Wasser oder Dest. Wasser aufgefüllt.

Basischer Bestandteil:

10,836 g NaHCO₃

Die einzelnen Bestandteile werden jeweils mit der Analysenwaage abgewogen.

106 ml des sauren Bestandteils, 10,836 g NaHCO₃ und 30 ml Calcium (Braun) werden zu 3552 g Millipore Wasser oder Dest. Wasser gegeben.

Die Ionenkonzentrationen im Dialysat, gemessen mittels BGA, sollten ungefähr innerhalb folgender Bereiche liegen:

HCO₃⁻ 25- 35 mmol/l

Na⁺ 105 – 140 mmol/l

K⁺ 1,5 - 2,5 mmol/l

Ca²⁺ 2,00 – 3,5 mmol/l

pH 7,0 - 7,3

7 Durchführung des Verfahrens

7.1 Vollblutgewinnung für die Extremitätenperfusion

Eine 1000 ml Gefäß wird mit 50 ml Citratpuffer (Zusammensetzung s. 5.2) gefüllt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Die Tiere werden nach gesetzlichen Richtlinien geschlachtet und nach dem Anstechen der Vena cava cranialis durch Entbluten getötet. Das Blut wird direkt nach der Betäubung und dem Anstich der Vene in der Blutflasche aufgefangen. Danach wird die Flasche vorsichtig geschwenkt, damit sich das Blut gut mit dem Citratpuffer vermischt. Es werden noch 2 ml Heparin (=

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



10.000 I.E. Heparin) hinzugegeben und wieder vorsichtig geschwenkt. Die Flasche wird verschlossen und ungekühlt zum Labor transportiert.

7.2 Organgewinnung

Entnahme

Direkt im Anschluss an die Blutgewinnung wird das Bein entnommen. Das Vorderbein wird im Handwurzelgelenk vom Schlachtmeister abgesetzt (Zeit notieren).

Danach wird das Bein unmittelbar unter dem Gelenk mittels Stichsäge abgesägt. Zuerst wird die A. mediana kanüliert und damit das Bein über dieses Gefäß unter zur Hilfenahme einer 60 ml Spritze mit 120 ml Spüllösung gespült (Zeit notieren). Anschließend wird die A. digitalis dors. com. III. ebenfalls kanüliert und mittels 60 ml Spritze mit 120 ml Spüllösung gespült (Zeit notieren). Anschließend werden die Gefäße nacheinander mit je 60 ml der Spüllösung 2 bis 3 mal gespült.

Die Kanülierung der A. mediana erfolgt entweder mittels Heidelberger Verlängerung oder mittels Spritzenpumpenleitung. Die A. digitalis dors. com. III wird mittels Ernährungssonde oder mittels Venenkatheter kanüliert. Die Katheter bzw. Sonden sind jeweils ca. 1,5 cm in die entsprechenden Gefäße vorzuschieben und anschließend mittels Faden festzubinden.

Die Spülung der Vordergliedmaßen auf dem Schlachthof zur Vermeidung von Koagulationen im Gefäßsystem erfolgt bis zum Austritt von klarer Flüssigkeit (ca. 480 - 720 ml).

Transport

Für den Transport wird das Bein in ein OP-Tuch eingeschlagen und mit Kühlakkus gekühlt in einer Kühlbox gelagert.

7.3 Präparation der Rinderextremität

Unmittelbar nach der Ankunft im Labor wird die Extremität gereinigt, wobei Klaue und Fell mit einer milden Seifenlösung mittels Nagelbürste unter fließendem Leitungswasser behandelt werden. Dabei ist der Kontakt von Wasser und Wundfläche zu vermeiden. Danach werden beide Klauenspitzen jeweils mittels einer Holzschraube durchbohrt um

Dokument SOP 1-
09
Version xx
Gültig ab xx
Seite von 13

Standardarbeitsanweisung
Rinderbeinperfusion



eine Aufhängungsmöglichkeit für das Bein zu erhalten. Während dieser Prozedur werden die Arterien gelegentlich, wenn nötig, mit der restlichen Spüllösung mittels der 60 ml-Spritze gespült.

7.4 Vorbereitung der Perfusionsapparatur

Zunächst werden folgende Geräte nacheinander eingeschaltet:

- Zentrifuge (einstecken)
- BGA (wenn nicht automatisch)
- OSM3
- Heizbad für Wasserkreislauf
- Kreiselpumpe für Wasserkreislauf + Aufdrehen der Wasserhähne
- Aufbauten roter Schalter am Regelkasten
- Waagen
- Data Acquisition / Switch unit 34970 A
- Computer
- alle Uhren (Computer Extr. Herz1-3 BGA +HP+Laboruhren) stellen

Anschließend werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Neuen Ordner auf dem Desktop einrichten (Datum)
- Waagenprogramm öffnen
- Starten mit Pfeiltaste \times , Speichern auf Desktop:
Waagen_Versuchsnummer_JJJJ_MM_TT Bsp.: Waagen_20030315.txt

Daraufhin wird das Dialysat angesetzt.

Anschließend erfolgen folgende Arbeitsschritte:

- Pufferlösungen (für pH-Kalibration) bereitstellen
- Kalibration der pH-Elektroden 7 + 4 + 10 (bei 40 °C 7,01---4,01---10,01)
- Befüllen des Perfusatorreservoirs mit 630 ml Dialysat und 28 gr. BSA
- Befüllen des Dialysatbehälters mit Rest des Dialysats
- Einschalten d. Kreiselpumpe (grüner Schalter)
- Überprüfen auf Dichtheit des Dialysatkreislaufes
- Starten des Programmes HP Benchlink Data Logger auf dem Desktop

- Einschalten der Rollenpumpen am Steuerkasten auf 200 ml/min
- Bestimmung des tatsächlichen Flusses der Rollenpumpe (oben) (Kreiselpumpe aus, Steuerung auf manuell).
- Justierung der Anzeige am Steuerkasten (range-Schraube) auf diesen Wert. Gleiches wird für 0 ml/min wiederholt (offset-Schraube).
- Angleich der Anzeige des Data Loggers über Tabellenblatt Setup in den Spalten range und offset auf den Wert am Steuerkasten
- Kontrolle und Angleich von Druck und Temperatur (Dialysat bei 39 °C)
- Speichern der Einstellungen unter dem entsprechenden Versuchsdatum
- Save Setup as: Bsp.: Versuch_20030315

7.5 Anschluss der Extremität an die Apparatur

Die pH-Regulation erfolgt über das O₂ und CO₂/Bikarbonatsystem.

Das Wärmebad wird so eingestellt (42 - 45°C), dass im Dialysatreservoir eine Temperatur von zirka 39°C erreicht wird.

Die Extremität wird nach einer kalten Ischämiezeit von höchstens 3,5 Stunden ± 0,5 an die Apparatur angeschlossen, nachdem im Dialysatreservoir eine Temperatur von 39°C erreicht wurde.

- Extremität an Halterung anlehnen und Drähte an den Holzschrauben an der Halterung einspannen (senkrecht im System, wobei die Klauenspitze nach oben zeigt, der Knochen hat leichten Kontakt zur Halterung), auf freie Beweglichkeit der Extremität – besonders von Katheter und Gefäßen – achten. Deshalb ist die Extremität möglichst weit oben am Metallstab und in der Mitte der Halterung zu befestigen.
- Rollenpumpen aus und gleichzeitig den Perfusionskreislauf am Ende verschließen (z.B. mit Klemmen), damit dieser nicht leerlaufen kann.
- Perfusionsfluss am Regelkasten auf Null stellen
- Luftfalle kontrollieren (muss zur Hälfte gefüllt sein)
- Katheter der Extremität am Perfusionskreislauf verbinden
- Pumpen an (Kippschalter)

- Blutfluss langsam auf 50-60 ml/min erhöhen

Ist der Perfusionsdruck deutlich höher als der Perfusionsfluss, ist möglicherweise das Gefäß oder der Katheter verdreht oder das Gefäß wird seitlich an die Halterung gedrückt.

7.6 Versuchsdurchführung

Innerhalb der 1-stündigen Anpassungsphase wird ein Perfusionsfluss von 190ml/min angestrebt. Bei späterem Druckanstieg über 135 mmHg, bei dann gleichbleibendem Fluss, wird die Perfusion abgebrochen.

Darüber hinaus wird der pH-Wert mittels Kohlendioxid- bzw. Sauerstoffbegasung möglichst innerhalb des physiologischen Bereiches (7,35 bis 7,45 im arteriellen Perfusat) eingestellt.

7.6.1 Probenentnahme

Vor dem Anschluss der Extremität an den Kreislauf (Zeitpunkt: Stunde 0) und dann in halbstündlichen Abständen werden arterielle (nur bei Bedarf), venöse Perfusat- und Dialysatproben (ca. 1 ml in Spritzen) über den gesamten Versuchszeitraum entnommen. Von den gewonnenen Proben werden unmittelbar nach der Entnahme eine Gasanalyse und eine Oximetrie durchgeführt. Sollten die Geräte besetzt sein, wird die entsprechende Spritze verschlossen (roter Verschlusskonus) und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert.

Außerdem werden bei Bedarf vom Perfusat Proben zur Bestimmung der Glucose und/oder Laktat Konzentration genommen. Dafür werden 2 ml Blut in ein Na-Fluorid-Röhrchen gegeben.

Vor der Probenentnahme sind die Entnahmestellen zu spülen (arteriell: 1 x aufziehen und Perfusat verwerfen, Dialysat: 1 x aufziehen und wieder in den Kreislauf spritzen).

7.6.2 Richtwerte und Korrekturmaßnahmen

pH Wert: Liegt der pH-Wert im sauren Bereich (< 7,35), wird die Sauerstoffbegasung erhöht bzw. die Kohlendioxidbegasung verringert. Ist der pH Wert > 7,45, so ist der



Kohlendioxidgehalt im Dialysat zu erhöhen bzw. der Sauerstoffgehalt entsprechend zu verringern und die Werte erneut zu überprüfen.

7.7 Gabe von Zusätzen bei 5h Perfusion

Substanz	Menge	Zeitpunkt / Applikationsort
Glucose	40 ml 5%ige Lösung 5 ml 5%ige Lösung	30 Minuten vor Versuchsbeginn / Dialysat zur Stunde 2,5; 3,0; 3,5 und 4,0 jeweils in das Dialysat
Insulin		vor Versuchsbeginn / Perfusat 1 ml Stunde 0,5 und 3,5

7.8 Datenerhebung

Perfusionsdruck	kontinuierliche Aufzeichnung während des Versuches (alle 5 Minuten)
Perfusionsfluss	kontinuierliche Aufzeichnung während des Versuches (alle 5 Minuten)
Klinisch-chemische Parameter	halbstündliche Entnahme von Perfusat- und Dialysatproben (BGA, Oximetrie)