

**Aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Erlangen- Nürnberg**

Direktor: Prof. Dr. M. W. Beckmann

**Das Modell des perfundierten Schweineuterus: Langzeitperfusion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Klaudija Geisler

Erlangen



**Gedruckt mit Erlaubnis der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg**

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. J. Schüttler
<b>Referent:</b>	Prof. Dr. R. Dittrich
<b>Korreferent:</b>	Prof. Dr. M. W. Beckmann
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	<b>01.08.2012</b>

**Widmung**  
Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	5
1.2. Summary.....	6
2. Einleitung.....	7
2.1. Zielsetzung.....	8
3. Material und Methoden.....	8
3.1. Anatomie und Physiologie des Uterus.....	8
3.1.1. Anatomie des menschlichen Uterus.....	8
3.1.2. Physiologie des menschlichen Uterus und hormoneller Regelkreis.....	9
3.1.3. Anatomie des Schweineuterus.....	11
3.1.4. Physiologie des Schweineuterus und hormoneller Regelkreis.....	12
3.2. Schweineuterus.....	14
3.3. Kanülierung.....	14
3.4. Perfusionssystem.....	15
3.5. Perfusionsmedium.....	16
3.5.1. Krebs- Ringer- Bikarbonat Pufferlösung.....	16
3.5.2. Modifizierte Krebs- Ringer- Bikarbonat Pufferlösung.....	16
3.6. Intrauterine Druckmessung.....	17
3.7. Verarbeitung der Daten und Statistik.....	19
3.7.1. Verarbeitung der Daten.....	19
3.7.2. Statistik.....	19
3.8. Versuchsdurchführung.....	20
3.8.1 Induktion rhythmischer Uteruskontraktionen.....	20
3.8.2. Vitalitätsparameter.....	20
3.8.3. Versuchsende.....	21
4. Ergebnisse.....	21
5. Diskussion.....	31
6. Literaturverzeichnis.....	35
7. Abkürzungsverzeichnis.....	39
8. Danksagung.....	41
9. Lebenslauf.....	42

## **1. Zusammenfassung**

### **Einleitung:**

Die Verwendung von Schweineuteri im Perfusionsmodell ist geeignet, um unterschiedlichste Substanzen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Vitalitätsparameter für bis zu 8 Stunden im physiologischen Bereich gehalten werden konnten. Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Mittel- und Langzeitperfusion von Schweineuteri mit Hilfe des etablierten offenen Perfusionsmodells.

### **Material und Methoden:**

Es wurde eine modifizierte Krebs – Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung (KRBP- Lösung) verwendet und mit einer herkömmlichen KRBP- Lösung, hinsichtlich der Überlebenszeit und der Kontraktionsparameter (ICP: intrauteriner Druck; AUC: Arbeit pro Zeitintervall; F: Kontraktionsfrequenz) der Schweineuteri verglichen. Es wurden insgesamt 30 Uteri perfundiert. Gruppe 1: n=11, KRBP- Lösung; Gruppe 2: n=8, modifizierte KRBP- Lösung mit Abpumpen des Überstands an Perfusat; Gruppe 3: n= 11, modifizierte KRBP- Lösung mit Abpumpen des Perfusates ca. alle 2 h und Substitution durch frisches Medium.

### **Ergebnisse:**

Für Gruppe 2 und 3 zeigten sich für ICP, AUC und F jeweils signifikant höhere Werte als für die Perfusion mit der herkömmlichen KRBP- Lösung in Gruppe 1. Die Überlebenszeit von bis zu 17 h (Mittelwert: 13,3 h) mit einem Anteil von 98% effektiver Kontraktionszeit in Gruppe 3 unterschied sich signifikant von Gruppe 1 ( $p < 0,001$ ).

### **Schlussfolgerung:**

Durch die Verwendung der modifizierten KRBP- Lösung in Kombination mit der Substitution des Beckenperfusates konnte das offene Modell zur Perfusion von Schweineuteri im Hinblick auf die Überlebenszeit und die Qualität der Kontraktionsparameter verbessert werden. Weiterführende metabolische Untersuchungen können mit geringem logistischem Aufwand und kostengünstig mit diesem Modell für die Mittel- und Langzeitperfusion von Schweinegebärmüttern unternommen werden.

## **1.2. Summary**

### **Introduction:**

The use of swine uteri in a perfusion model is suitable to investigate various substances under physiological conditions. It has been shown that the viability parameters could be kept for up to 8 hours in the physiological range. The objective of this study was the medium- to long term perfusion of swine uteri by using the established open perfusion model.

### **Materials and methods:**

In the perfusion of swine uteri a modified Krebs- Ringer- bicarbonate- buffer solution (KRBP- solution) and a conventional KRBP- solution were compared, in terms of survival and the contraction parameters (ICP: intrauterine pressure; AUC: work per time interval, F: frequency of contractions). A total number of 30 uteri were perfused. Group 1: n = 11, KRBP- solution; Group 2: n = 8, modified KRBP- solution with pumping down the supernatant of perfusate; Group 3: n = 11, modified KRBP- solution with pumping down the perfusate every 2 h and substitution by fresh medium.

### **Results:**

Group 2 and 3 showed for ICP, AUC and F each significantly higher value than for the conventional perfusion with KRBP- solution in Group 1. The survival time of up to 17 h (mean: 13.3 h) with a ratio of 98% effective contraction time in Group 3 differed significantly from Group 1 ( $p < 0.001$ ).

### **Conclusion:**

By using the modified KRBP- solution in combination with substitution of the perfusate the open model for the perfusion of swine uteri has been improved in terms of survival time and the quality of the contraction parameters. With this model for the medium- to long term perfusion of swine uteri further metabolic studies may be undertaken in a cost- effective way and with low logistical effort.

## 2. Einleitung

Die experimentelle Organperfusion hat ihre Wurzeln in der Transplantationsmedizin zur Untersuchung physiologischer, pathophysiologischer und metabolischer Vorgänge innerhalb des Gewebes und der Zellen (24, 43, 44). Es wurden bereits mit Hilfe der Langzeitperfusion Untersuchungen an Leber, Lunge und Niere erfolgreich durchgeführt und beschrieben (1, 24, 34). Zum Organerhalt bediente man sich verschiedener Perfusionslösungen, so verwendete Iwasaki et al. unter anderem ein Krebs- Henseleit Ringer Medium zur Langzeitperfusion von isolierten Rattenherzen (23).

Bulletti et al. entwickelten 1986 ein offenes extrakorporales Perfusionssystem, d.h. ohne Rezirkulation des Mediums, für den menschlichen Uterus (9, 10, 12). Sie führten an extirpierten Uteri unterschiedliche in- vitro Untersuchungen, wie z.B. Hormonbestimmungen im Endo- und Myometrium und Ableitung elektromechanischer Aktivität der glatten Muskulatur durch. Außerdem beschäftigten sie sich mit den hormonellen Einflüssen auf die uterine Kontraktilität, während unterschiedlicher menstrueller Zyklusphasen (7, 11, 13). Im Jahre 1987 konnte die erste frühe menschliche Schwangerschaft in einem perfundierten Uterus erzeugt werden (12). Basierend auf den Entwicklungen von Bulletti et al. etablierten Dittrich und Maltaris et al. 2003 ein Modell zur Perfusion von Schweineuteri (19). Die Verwendung von Schweineuteri im Perfusionsmodell ist geeignet, um an einer großen Stückzahl von Organen die Wirkung unterschiedlichster Medikamente unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind gut mit humanen Verhältnissen vergleichbar. Es ergeben sich zwar Unterschiede zwischen Mensch und Schwein in Anatomie und Physiologie des Uterus, dennoch sind sich die Organe im makroskopischen wie im mikroskopischen Aufbau ähnlich. Auch die Systematik der Funktionen der endokrinologischen Regelkreise erlaubt direkte Vergleiche. Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass unter optimalen Versuchsbedingungen die Vitalitätsparameter für bis zu 8 Stunden im physiologischen Bereich gehalten werden konnten (19). Unter anderem wurde von Dittrich et al. der Einfluss von Oxytocin (19), von Müller et al. die Rolle von Östrogen, Progesteron (32) und Prostaglandinen (30) und von Künzel et al. die Wirkung von Spasmolytika (28) auf die Kontraktilität von Schweineuteri im Perfusionsmodell untersucht. Des Weiteren konnten mit diesem Modell intrauterine

Transportmechanismen in Richtung des dominanten Follikels analysiert werden (31). Richter et al. publizierten die Ergebnisse einer Langzeitperfusion mit Hilfe eines geschlossenen Perfusionsmodell am humanen Uterus und einer modifizierten Krebs-Ringer- Birkarbonat- Puffer Lösung in Normothermie. Insgesamt wurden 25 humane Uteri bis zu 24 h unter Bewahrung der Zellintegrität und somit unter physiologischen Bedingungen untersucht. Durch die Verwendung eines geschlossenen Systems mit Rezirkulation des Mediums konnte im Vergleich zu Buletti et al. eine deutliche Reduktion der Menge an Perfusat erreicht werden (36).

## **2.1. Zielsetzung**

Wie von Dittrich et al. publiziert, konnte die Vitalität von Schweineuteri im offenen Perfusionsmodell bis zu 8 h erhalten werden (19). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Mittel- und Langzeitperfusion von Schweineuteri mit Hilfe des etablierten offenen Perfusionsmodells. Zukünftig sollen physiologische und metabolische Fragestellungen, wie z.B. die Rolle der M<sub>3</sub>- Cholinozeptoren am Schweineuterus untersucht werden. Hierfür wurde in Anlehnung an Richter et. al (36) eine modifizierte Krebs – Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung verwendet und mit dem bisher verwendeten Perfusionsmedium hinsichtlich der erreichbaren Überlebenszeit der Schweineuteri in einem experimentellen Ansatz verglichen.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Anatomie und Physiologie des Uterus**

#### **3.1.1. Anatomie des menschlichen Uterus**

Der menschliche Uterus ist ein flüssigkeitsgefülltes birnenförmiges und vorwiegend muskuläres Hohlorgan. Anatomisch unterteilt sich die Gebärmutter in das Corpus uteri, welches die kranialen 2/3 einnimmt und in die kaudal gelegene Cervix uteri.

Beide Abschnitte gehen an einer Engstelle, dem so genannten Isthmus uteri, ineinander über. Die Wand ist dreischichtig, bestehend von innen nach außen aus dem sezernierenden Endometrium (1-8 mm), dem Myometrium (1,5- 2,5 cm) und dem Perimetrium als peritoneale Verschiebeschicht. Der Uterus einer gebärfähigen



Frau wiegt 80- 120 g. In der Schwangerschaft wird das Gewicht jedoch durch Hypertrophie und Hyperplasie des Myometriums mehr als verzehnfacht (14, 17).

Die Gebärmutter dient vor allem der Entwicklung und Austreibung des embryonalen Keimes. Weiterhin verhindert sie weitgehend die Aszension pathologischer Keime und gewährleistet den Spermientransport. Der Uterus ist im Becken durch einen bindegewebigen elastischen Halteapparat fixiert, durch den auch die versorgenden Blutgefäße und Nervenbahnen ziehen. Die Blutversorgung stammt vorwiegend aus der Arteria uterina, die ein Ast der Arteria iliaca interna ist und im Ligamentum latum zum Uterus verläuft. Hier anastomosiert sie über einen Ramus ovaricus mit der Arteria ovarica. Innerhalb des Versorgungsgebietes sowie zur Gegenseite bestehen zahlreiche Kollateralen. Die vegetative Innervation stammt aus dem Plexus uterovaginalis, der mit sympathischen Fasern aus dem lumbalen Grenzstrang und parasymphatischen Fasern aus dem sakralen Plexus pudendus gebildet wird (20, 37).

### **3.1.2. Physiologie des menschlichen Uterus und hormoneller Regelkreis**

Das Endometrium der geschlechtsreifen Frau unterliegt ausgeprägten zyklischen Veränderungen, die durch wechselnde hormonelle Einflüsse verursacht werden.

Der Zyklus kann in vier Phasen eingeteilt werden: Proliferations-, Sekretions-, Ischämie-, und Desquamationsphase.

Der menschliche Zyklus dauert gewöhnlich 28 Tage und beginnt mit der Desquamationsphase, der so genannten Menstruation, in der die innerste Schicht des Endometriums, die Lamina functionalis, abgestoßen wird.

Die Proliferationsphase ist durch die Östrogenstimulation geprägt, wodurch es vom 5. bis 14. Tag zu einer Regeneration der Lamina functionalis kommt. Diese Phase endet zur Zyklusmitte mit dem Follikelsprung. Am 15. Tag geht der Zyklus in die Sekretionsphase über, in der die Schleimhaut unter dem Einfluss des Gelbkörperhormons Progesteron auf die Implantation der Blastozyste vorbereitet wird. Hierbei kommt es zu einer Verdickung des Endometriums auf bis zu 8 mm durch starkes Längenwachstum der Drüenschläuche und vermehrte Schleimsekretion.

Bleibt eine Konzeption in dem jeweiligen Zyklus aus, so sinken Östrogen- und Progesteronspiegel durch Degeneration des Corpus luteum und es kommt zu einer, von

periodischen Kontraktionen begleitet, ischämischen Abstoßungsreaktion der Lamina functionalis. Anschließend beginnt der Zyklus erneut (20, 21, 39, 40, 42). Die übergeordnete Regulation dieses Systems übernehmen Kernareale im Hypothalamus, die das Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) pulsatil alle 70- 90 min freisetzen und in der Hypophyse die Freisetzung des Follikel- stimulierenden Hormons (FSH) und luteinisierenden Hormons (LH) stimulieren (Abb.1).

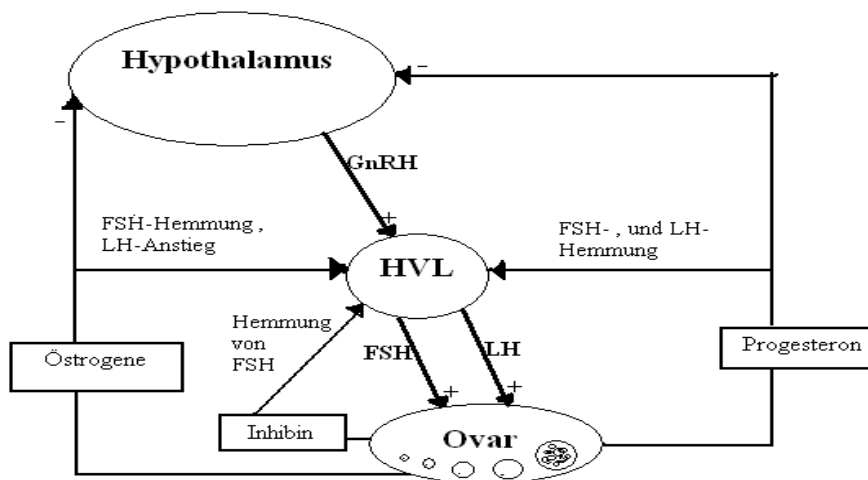


Abb.1 : humaner hormoneller Regelkreis

Übersteigt die pulsatile Freisetzung von FSH und LH einen bestimmten Schwellenwert, beginnt die Follikelreifung im Ovar. Der reife Follikel wird von Granulosazellen ausgekleidet, die FSH- Rezeptoren besitzen und nach FSH-abhängiger Induktion der Aromatase, das aus den Thekazellen stammende und durch LH- Stimulus synthetisierte Testosteron zu Östradiol aromatisieren. Östradiol inhibiert über einen „negativen feed-back“ Mechanismus die Ausschüttung von GnRH aus dem Hypothalamus. Im Rahmen eines „positiven feed- back“ wird die präovulatorische LH-Freisetzung massiv stimuliert. Es kommt zum so genannten LH- peak, der die Ovulation und die nachfolgende Entstehung des Gelbkörpers (Corpus luteum) aus dem rupturierten Follikel auslöst. Das freigesetzte Östradiol bewirkt eine Proliferation des Endometriums und eine Sensibilisierung des Myometriums für Oxytocin. Oxytocin ist ein Hormon des Hypophysenhinterlappens und eines der stärksten Uterotonika. Der Gelbkörper produziert Progesteron, das die Zahl der Östrogenrezeptoren am Uterus vermindert und die Sekretion des Endometriums fördert. Außerdem hemmt Progesteron über ein „negatives feed-

back“ die Freisetzung von FSH und LH aus der Hypophyse. Gegen Ende der Lutealphase bildet sich der Gelbkörper zurück, sofern keine Konzeption stattgefunden hat. Die Progesteronkonzentration und Östrogenkonzentration sinken, die FSH und LH Ausschüttung nimmt wieder zu, die Menstruationsblutung setzt ein (Abb.2) (17, 21, 39, 40).

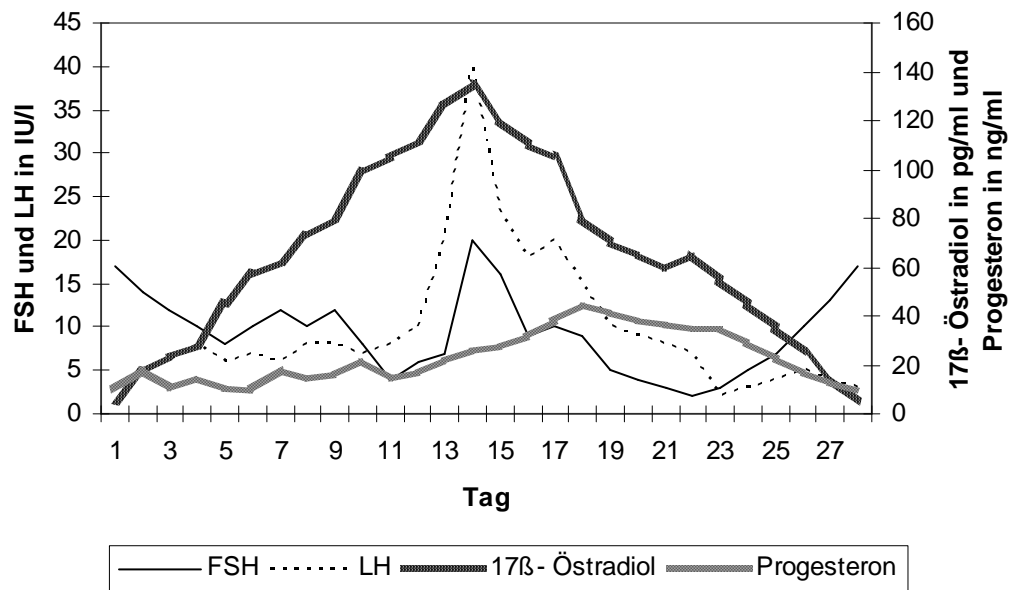


Abb. 2: Zyklus der Frau

### 3.1.3. Anatomie des Schweineuterus

Der Uteruskörper (Corpus uteri) ist kurz, steht über die beiden Uterushörner (Cornua uteri) mit den paarigen Eileitern strukturell und funktionell in Verbindung und wird durch den Gebärmutterhals (Cervix uteri) von der Vagina getrennt. Die langen Hörner beschreiben Windungen ähnlich dem Dünndarm und gehen in die ca. 30 cm langen Eileiter (Tuba uterina) über. Die Ovarien sind ca. 5 cm lang, rundlich, unregelmäßig höckerig und durch die vielen vorspringenden Follikel brombeerartig geformt. Die Wand der Gebärmutter gliedert sich anatomisch von innen nach außen in eine:

- 1) Tunica mucosa (Endometrium)
  - Lamina propria mucosae
- 2) Tunica muscularis (Myometrium)

3) Tunica subserosa

4) Tunica serosa

Endometrium:

Die Gebärmutter Schleimhaut setzt sich aus einem einschichtigem bis mehrschichtigem und hochprismatischem Epithel und der drüsenreichen Lamina propria mucosae zusammen. Die Zellen tragen zeitweise Kinozilien und Microvilli.

Die sekretorische Aktivität der ekkrinen Drüsen unterliegt auch zyklusabhängigen Hormonveränderungen.

Myometrium:

Die Tunica muscularis besteht aus glatten Muskelfaserbündeln, die in den Uterushörnern und im Uteruskörper zirkulär (Stratum musculare circulare) angeordnet sind. Zusätzlich sind in äußeren Schichten modifizierte Fibroblasten ausgebildet, die als kontraktile Myofibroblasten die glatten Muskelzellen unterstützen. Dieser zirkulären Muskelschicht liegt außen eine ausgeprägte Gefäß- und Nervenschicht auf, von der aus das Endometrium versorgt wird.

Perimetrium:

An das Myometrium schließt sich nach außen eine glatte Muskelschicht, mit longitudinalem Faserverlauf (Stratum musculare longitudinale) an, welche beidseitig ins Ligamentum latum uteri einstrahlt und sich kaudal in die Zervixmuskulatur fortsetzt (33, 38).

#### **3.1.4. Physiologie des Schweineuterus und hormoneller Regelkreis**

Durch die Ausschüttung gonadotroper Hormone aus der Hypophyse, dem FSH, LH und Prolaktin, wird der Zyklus des Tieres reguliert und gesteuert. Insgesamt dauert der Zyklus bei der Sau 20 – 21 Tage (32, 33, 38). Wie beim Menschen stimuliert FSH die Ovarfollikel und LH die Stromazellen der Theka follicularis Androgene (Androstendione, Testosteron) zu bilden, welche nachfolgend von den Granulosazellen zu Östrogenen aromatisiert werden. Außerdem löst der LH- peak die Ovulation aus. Prolaktin hingegen steuert die Produktion von Progesteron im Corpus

luteum. Über Prostaglandin E<sub>2</sub> besteht ein Rückkopplungsmechanismus, der die Abgabe gonadotroper Hormone aus der Adenohypophyse reguliert.

Man unterscheidet beim Tier den Proöstrus (Vorbrunst), den Östrus (Brunst), den Metöstrus (Nachbrunst) und den Disöstrus (Zwischenbrunst). Unter klinischen Gesichtspunkten fasst man neuerdings Metöstrus, Disöstrus und Proöstrus als Interöstrus zusammen und stellt es dem Östrus gegenüber. Die Zahl der Follikel, die während eines Zyklus der Sau heranreifen variiert von 8 bis 20 (27). Im Proöstrus wachsen unter Östrogeneinfluss die Follikel heran und die Proliferation des Endometriums beginnt. Im Östrus reifen die Follikel aus und der Östrogenspiegel erreicht vor der Ovulation sein Maximum. Die Schleimhaut baut sich zum Sekretionsepithel auf. Der Zeitpunkt des Eisprungs variiert von Tier zu Tier zwischen dem Ende des Östrus und unterschiedlichen Zeiten des Metöstrus. Während des Metöstrus baut sich das Corpus haemorrhagicum zum Corpus luteum um, womit auch die Synthese von Progesteron einsetzt. Der Disöstrus stellt sozusagen die Phase der Hochblüte des Gelbkörpers dar und bildet sich unter dem Einfluss von Prostaglandin F<sub>2α</sub> aus der Uterusschleimhaut zurück. Gleichzeitig kommt es, vermittelt durch Progesteron, zu maximaler Sekretabgabe, die bei einer eintretenden Trächtigkeit aufrechterhalten wird. Bleibt eine Nidation aus, verringert sich in der Involutionsphase kontinuierlich die Sekretabgabe, die Dichte der Vaskularisation nimmt ab und die Schlauchdrüsen bilden sich zurück (33) (Abb.3).

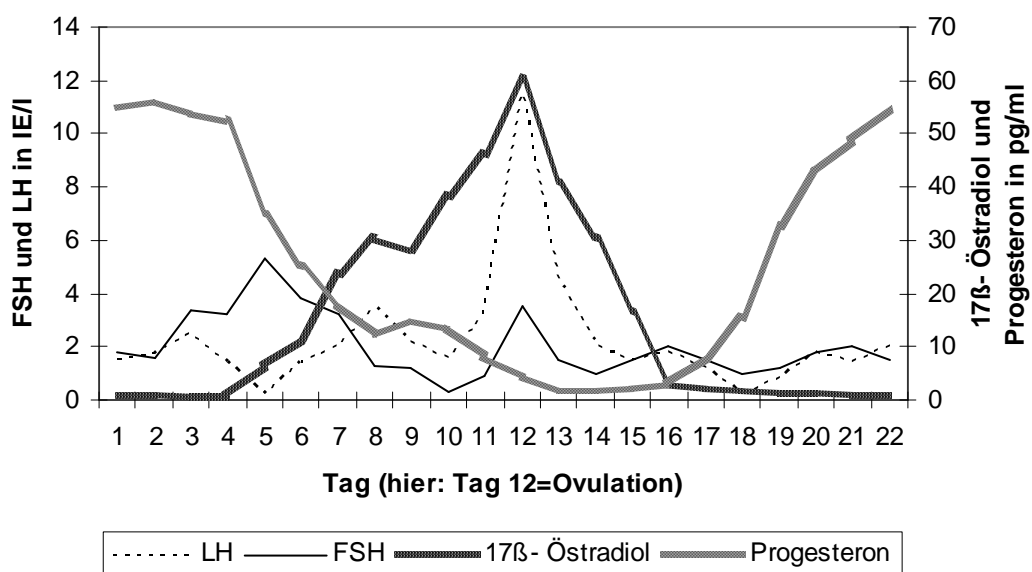


Abb.3: Zyklus der Sau

### **3.2. Schweineuterus**

Morgens wurden unmittelbar nach der Tötung (Elektroschock, 1,5 A, 400 V, 4 s) der Schweine im Erlanger Schlachthof, 10 bis 15 Schweineuteri abgeholt. Die Organe stammten alle von 5 bis 18 Monate alten gesunden Schweinen. Etwa 2 bis 4 Uteri eigneten sich bzgl. Größe, Gewicht, Allgemeinzustand und Kanülierbarkeit der Arteriae uterinae für die Versuche.

### **3.3. Kanülierung**

Die geeigneten Uteri wurden in gleicher Weise für die Kanülierung präpariert. Mit chirurgischem Operationsbesteck wurden die Arteriae uterinae beidseits im Ligamentum latum uteri von umgebendem Bindegewebe bis auf die Adventitia befreit. Anschließend erfolgte die Kanülierung der Arterien mit Abbocaths der Größe 16 G und mit Fäden der Sorte Vicryl 3-0 (Fa. ETHICON Johnson & Johnson Int., Brüssel) durch Knoten fixiert (Abb. 4). Die richtige Lage des Abbocaths und die Durchgängigkeit des uterinen Gefäßsystems wurde durch vorsichtige Spülung beider Arteriae uterinae mit jeweils 2,5 ml NaCl 0,9% überprüft. Anschließend erfolgte eine intraarterielle Injektion mit Heparinlösung (2500 I.E. auf 5 ml NaCl 0,9%; Heparin Natrium Braun 25000 I.E. Durchstechflasche, B. Braun Melsungen AG) um einer Thrombenbildung vorzubeugen, bzw. bereits geronnenes Blut zu lösen. Zusätzlich wurden die Tuben und der, das Ovar umgebende, Gefäßplexus abgebunden, damit die Perfusionslösung an dieser Stelle nicht entweichen konnte und ein besserer uteriner Perfusionsdruck aufgebaut sowie gehalten werden konnte. Eventuell störende hormonelle Einflüsse, durch Östrogene und Gestagene der Ovarien, sollten hierdurch minimiert werden.

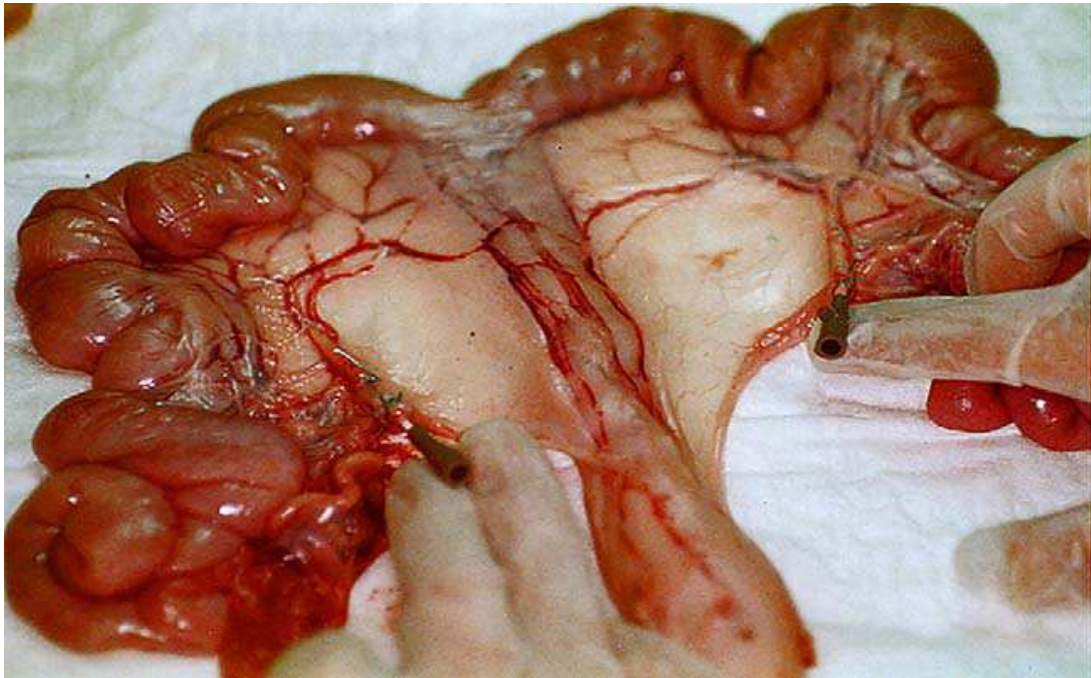


Abb. 4: Beidseitig kanülierter Schweinuterus (Bild aus 29).

### 3.4. Perfusionssystem

Nach der Kanülierung wurden die zur Perfusion vorbereiteten Organe in ein temperiertes Organbad gelegt. Das Organbad bestand anfangs aus einem Liter, auf 37°C temperiertem, Perfusionsmedium. Die Temperatur wurde während des gesamten Versuchs konstant zwischen 36,5 und 37,5°C eingestellt (Temperaturmesssonde, Raumedic, Fa. Rehau AG & Co., Germany). Das Perfusionsmedium wurde in einem Wasserschwenkbad konstant auf 37°C erwärmt und mit Carbongas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Fa. Linde, Frankfurt) oxygeniert. Die Abocaths waren mit einem Silikonschlauchsystem verbunden. Eine Rollenpumpe (Fa. Heidolph, Germany) beförderte das Medium im Schlauchsystem mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit in das arterielle Gefäßsystem des Organs. Die Flussrate wurde innerhalb von 10 bis 15 Minuten schrittweise auf ca. 15 ml/min gesteigert. Das Perfusat floss über das offene venöse Gefäßsystem des Uterus kontinuierlich ins Organbad ab, d.h. es fand keine Rezirkulation des Mediums ins arterielle Gefäßsystem statt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

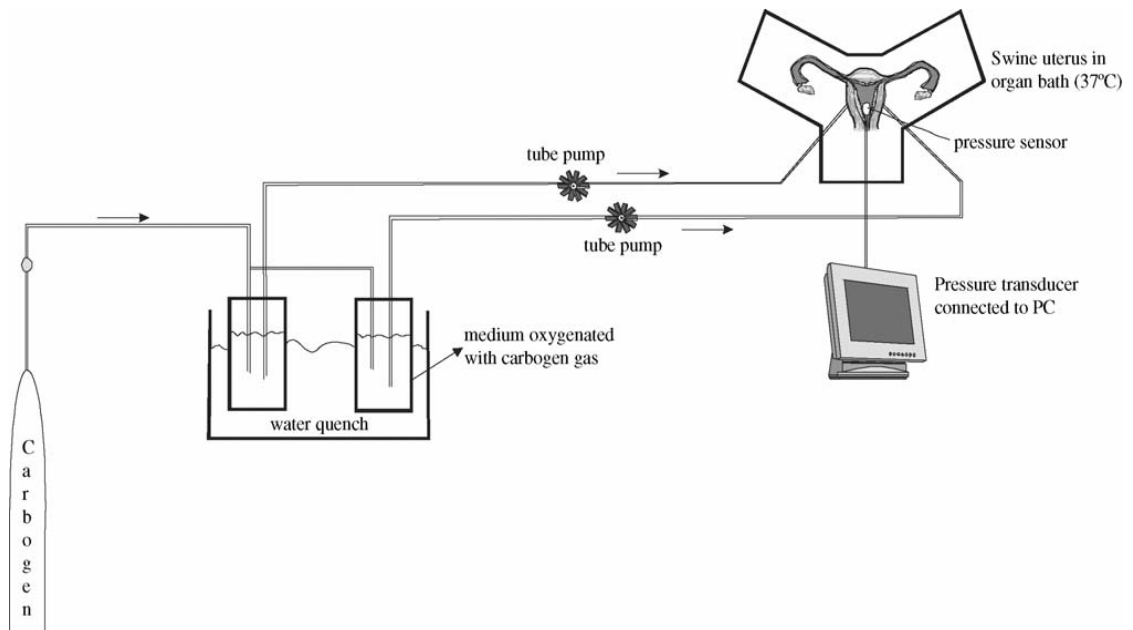


Abb.5: Schematischer Aufbau des offenen Systems zur Perfusion von Schweineuteri (Bild aus 29)

### 3.5. Perfusionsmedium

#### 3.5.1. Krebs- Ringer- Bikarbonat Pufferlösung

Die physiologische Krebs- Ringer- Bikarbonat Pufferlösung wird seit 2003 für Versuche am perfundierten Schweinuterus von Dittrich und Müller et al. erfolgreich verwendet (19). Diese Lösung wird nach Anleitung der Firma Sigma- Aldrich, Steinheim, selbst hergestellt (siehe Tabelle 1).

#### 3.5.2. Modifizierte Krebs- Ringer-Bikarbonat Pufferlösung

Diese Perfusionslösung, eine modifizierte Krebs- Henseleit- Bikarbonat- Pufferlösung, wurde bereits von Richter et al. zur extrakorporalen Mittel- und Langzeitperfusion von humanen Uteri mit Rezirkulation des Perfusates angewendet (36).

Die Gewebektivität und –funktionalität konnte mit dieser Lösung für eine Dauer von bis zu 24 h aufrechterhalten werden (25, 36). Die Zusammensetzung der modifizierten Lösung (siehe Tabelle 1) gewährleistete eine isoosmolare Ionenkonzentration, einen annähernd physiologischen pH- Wert (7,36 - 7,44) und



hielt einen kolloid-osmotischen Druck in den Gefäßen von etwa 24 mmHg aufrecht. Die Saccharose, als impermeabler Zucker, wurde eingesetzt, um einer Ödembildung im Gewebe vorzubeugen. Das Tripeptid Gluthation diente als Reduktionsmittels und Radikalfänger (41). Das Gleichgewicht zwischen seiner reduzierten und oxidierten Form wurde über das eingesetzte Dithiothreitol vermittelt. Zur Unterstützung der Verstoffwechslung von Glucose wurde dem Perfusionsmedium zusätzlich Altinsulin (Actrapid® HM NovoLet® 3 ml 100 I.E./ml Injektionslösung, Novo Nordisk Pharma GmbH) zugegeben. Im Gegensatz zu Richter et al. wurde auf die Zugabe von Refobacin verzichtet (36). Die Substanzen wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und zusätzlich in einem auf 37°C temperierten Schwenkbad gut durchmischt.

<b>Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung</b>	<b>Modifizierte Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung</b>
MgCl <sub>2</sub> : 0,05 g/l	NaCl: 6,896 g/l
KCL: 0,34 g/l	KCL: 0,372 g/l
NaCl: 7,0 g/l	MgSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O: 0,246 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 0,1 g/l	CaCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O: 0,547g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O: 0,18 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 0,136g/l
Glukose + H <sub>2</sub> O: 1,98 g/l	NaHCO <sub>3</sub> : 2,305g/l
NaHCO <sub>3</sub> : 1,26 g/l	D-Glucose: 1,5g/l
CaCl + 2H <sub>2</sub> O: 0,05 g/l	Saccharose: 0,7g/l
	Gluthation: 0,05g/l
	1,4-Dithiothreitol: 0,1g/l
	Altinsulin: 50 I.E./l

Tabelle 1: Menge an benötigten Substanzen für 1-fach konzentrierte Lösungen der verwendeten Perfusionsmedien

### 3.6. Intrauterine Druckmessung

Der intrauterine Druck (ICP) wurde mit Hilfe eines Doppelchip- Mikrokatheter (Urobar 8 DS-F, Raumedic, Fa. Rehau AG & Co., Rehau, Germany) aufgezeichnet

(Abb. 6). Die Messsensoren waren im Abstand von 8 cm im Katheter integriert, so dass nach behutsamem Einführen der distale Sensor im Corpus uteri und der proximale Sensor im Isthmus uteri spannungsfrei zu liegen kam. Anschließend wurde der Druckkatheter mittels Einzelknopfnaht bei ca. 11 cm fixiert, um ein Herausgleiten während der Messung zu verhindern. Danach wurde der Druckkatheter über ein Verbindungskabel mit dem zugehörigen Monitorgerät (Datalogger, MPR1, Raumedic, Fa. Rehau AG & Co., Rehau, Germany) verbunden.

Der Datalogger ermöglichte eine zeitgleiche Aufzeichnung der Druckänderungen an beiden Messpunkten (ICP1, ICP2) und eine kontinuierliche Temperaturmessung. Für jede Sekunde wurde jeweils ein Druckwert in der Einheit mmHg vom Datalogger aufgezeichnet. Über ein ZVD- Messmodul erfolgte die Darstellung der Druckverhältnisse im Gefäß- und Schlauchsystem.

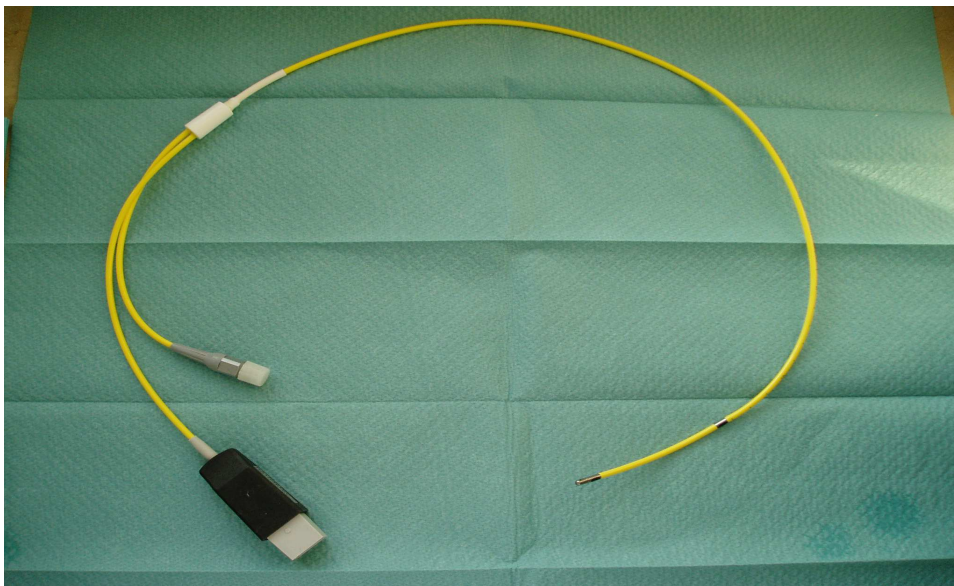


Abb. 6: Doppelchip- Microkatheter (Urobar 8 DS-F, Raumedic, Fa. Rehau AG & Co., Rehau, Germany)

Zu Beginn jedes Versuchs und der dazugehörigen Aufzeichnung, wurden die Messelektroden ICP 1 und ICP 2 sowie die ZVD- Messung auf 0 mmHg geeicht. Über eine Verbindung zum PC konnte der Versuchsablauf mit Hilfe der zugehörigen Software (Datalogg, Raumedic, Fa. Rehau AG & Co., Rehau, Germany) grafisch mitverfolgt und im Anschluss gespeichert sowie ausgewertet werden.

## **3.7. Verarbeitung der Daten und Statistik**

### **3.7.1. Verarbeitung der Daten**

Am Ende eines jeden Versuches wurden die vom Datalogger aufgezeichneten Daten in ein Microsoft Windows Excel Format zur weiteren Bearbeitung übertragen. Für jeden Uterus wurden die Daten eines Zeitintervalles von jeweils 10 min, jeweils 20 min nach Versuchsbeginn, nach einer Stunde und stündlich bis zum Versuchsende (objektiver Tod des Uterus) analysiert. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit der Origin- Software (Origin lab Version 8.5, OriginLab Corporation, Northampton, USA). Origin generierte aus den Daten ein geglättetes Kurvendiagramm, welches dem Artefakt reduzierten Kontraktionsverlauf des Uterus im entsprechenden Zeitintervall entsprach.

Eine Basislinie definierte die Fußpunkte der Kurve zur Berechnung der absoluten Druckmaxima und des Flächenintegrals (AUC). Origin summierte ausgehend vom Fußpunkt der Kurve, die für jede Sekunde gemessenen Druckwerte. Dies entsprach dem Integral der Kurve. Der Betrag des Integrals (AUC) selbst repräsentierte als Summe aller gemessenen Druckwerte in einem bestimmten Zeitintervall, die verrichtete Arbeit sowie die Leistung der Gebärmuttermuskulatur. Die Anzahl der Kontraktionen pro Zeitintervall wurde als Kontraktionsfrequenz (F) ausgewertet.

### **3.7.2. Statistik**

Die in Origin ermittelten Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel und SPSS (IBM SPSS Statistics 19.0.0.1) weiter statistisch aufgearbeitet. Gruppenvergleiche erfolgten nach Vorprüfung hinsichtlich Normalverteilung, der jeweiligen Voraussetzungen und dem entsprechenden Skalenniveau der zu analysierenden Attribute mittels Kruskal-Wallis-Test bzw. einfaktorieller Varianzanalyse (Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ ; post-hoc  $\alpha=0,017$ ). Im post- hoc Verfahren kamen der Mann-Whitney- U Test, der Tukey und Tamhane Test.

### **3.8. Versuchsdurchführung**

Für die Versuchsdurchführung wurden die Uteri in drei Gruppen aufgeteilt:

In Gruppe 1 wurden 11 Uteri mit einer Krebs- Ringer- Bikarbonat-Puffer Lösung perfundiert (s. Tabelle 1).

In Gruppe 2 wurden 8 Uteri mit der modifizierten Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer Lösung perfundiert (s. Tabelle 1). Zusätzlich wurde in dieser Gruppe der Überstand an Perfusat im Becken abgepumpt.

In Gruppe 3 wurden 11 Uteri mit der modifizierten Krebs- Ringer- Bikarbonat-Puffer Lösung perfundiert (s. Tabelle 1). Zusätzlich wurde in dieser Gruppe das angesammelte Perfusat aus dem Organbecken ca. alle 2 h vollständig physikalisch, mit Hilfe der Schwerkraft, abgepumpt und durch frisches Medium ersetzt.

#### **3.8.1. Induktion rhythmischer Uteruskontraktionen**

Um die Gebärmütter optimal mit Sauerstoff, Nährstoffen und Elektrolyten zu sättigen, wurde die initiale Perfusion für ca. 1 h aufrechterhalten. Konnten in dieser Phase keine spontanen Uteruskontraktionen registriert werden, wurde Oxytocin (Syntocinon® 10 I.E. = 50mg/ml, Fa. Novartis Pharma, Nürnberg) in aufsteigender Dosierung von 0,1 I.E., 0,5 I.E., 1 I.E. im Abstand von jeweils ca. 15 min zur Induktion rhythmischer Kontraktionen als Bolus über das Schlauchsystem verabreicht (19). Zeigten sich weiterhin keine rhythmischen Kontraktionen wurde der Versuch abgebrochen.

#### **3.8.2. Vitalitätsparameter**

Bei allen Organen wurden zu Beginn der Versuchsreihe und im 1 Stunden Intervall Vitalitätsparameterbestimmungen am Blutgasanalysegerät (ABL 800 FLEX, Radiometer GmbH, 47877 Willich, Deutschland) durchgeführt. Aus venöser Abtropfflüssigkeit wurden pH und Laktat bestimmt.

### **3.8.3. Versuchsende**

Der Endpunkt eines Versuches war definiert als das Fehlen von messbaren Uteruskontraktionen bzw. das Ausbleiben von rhythmischen Kontraktionen nach Applikation von Oxytocin- Boli in aufsteigender Dosierung von 0,1 I.E., 0,5 I.E., 1 I.E. im Abstand von jeweils ca. 15 min.

### **4. Ergebnisse:**

Es wurden insgesamt 30 Uteri (n=30) perfundiert. Das mittlere Gewicht der Organe lag bei 152 g (75 g- 200 g).

#### **Gruppe 1: Krebs- Ringer Bikarbonat Puffer Lösung**

Es wurden insgesamt 11 Uteri (n=11) mit einem mittleren Startgewicht von 168 g (130 g – 200 g) mit der herkömmlichen Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung perfundiert (s. Tabelle 1). Bei allen Organen wurden initial rhythmische Kontraktionen mit Hilfe von Oxytocin induziert. Der mittlere Druckwert (ICP) für ICP 1 betrug 2,37 mmHg und für ICP 2 1,86 mmHg (Abb. 7, 16). Die mittlere AUC 1 und AUC 2 betrug 78,15 mmHg bzw. 48,11 mmHg (Abb. 8, 17). Die mittlere Frequenz 1 (F1) lag bei 6,0 Kontraktionen und die mittlere F2 lag bei 5,1 Kontraktionen pro Zeitintervall (Abb. 9, 18). Makroskopisch sichtbare Kontraktionen zeigten sich im Mittel nach einer Latenz von 2,35 h. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 9,3 h (R= 7- 11 h). Die effektive Kontraktionszeit (Beginn sichtbarer Kontraktionen bis zum Tod des Uterus) der Organe lag im Mittel bei 6,95 h, d.h. während 75% der Überlebenszeit fanden Kontraktionen statt (Abb. 19).

Der pH- Wert nach 1 h Perfusion lag im Mittel bei 7,6 und veränderte sich bis zum Ende der Perfusionszeit auf 6,9 (Abb. 20). Der mittlere Laktat- Wert stieg entsprechend von 1,43 mmol/l auf 4,1 mmol/l (Abb. 21).

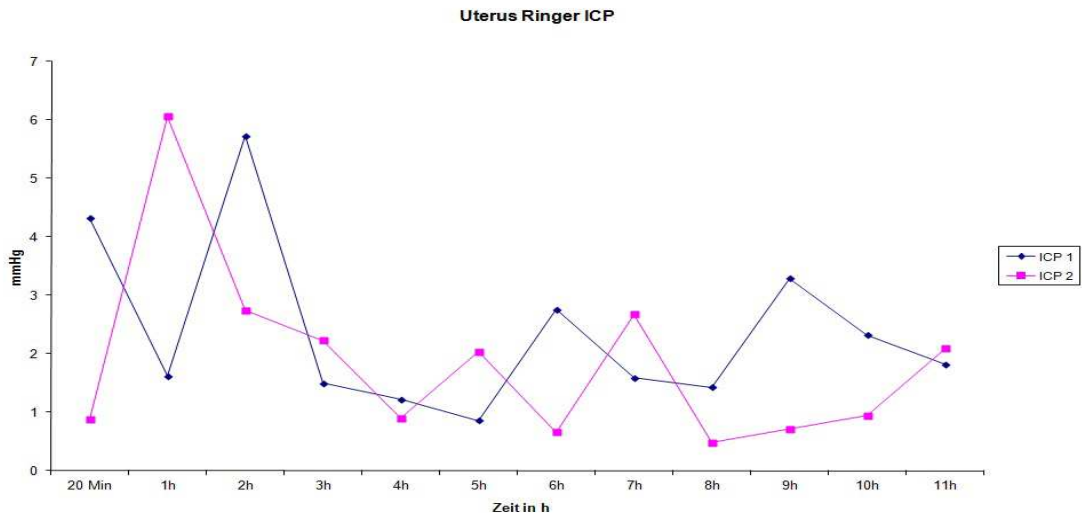


Abb. 7: mittlere Druckwerte in mmHg (ICP 1= blau; ICP 2= magenta) im Zeitverlauf bis zu 11 h nach Perfusion mit Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung

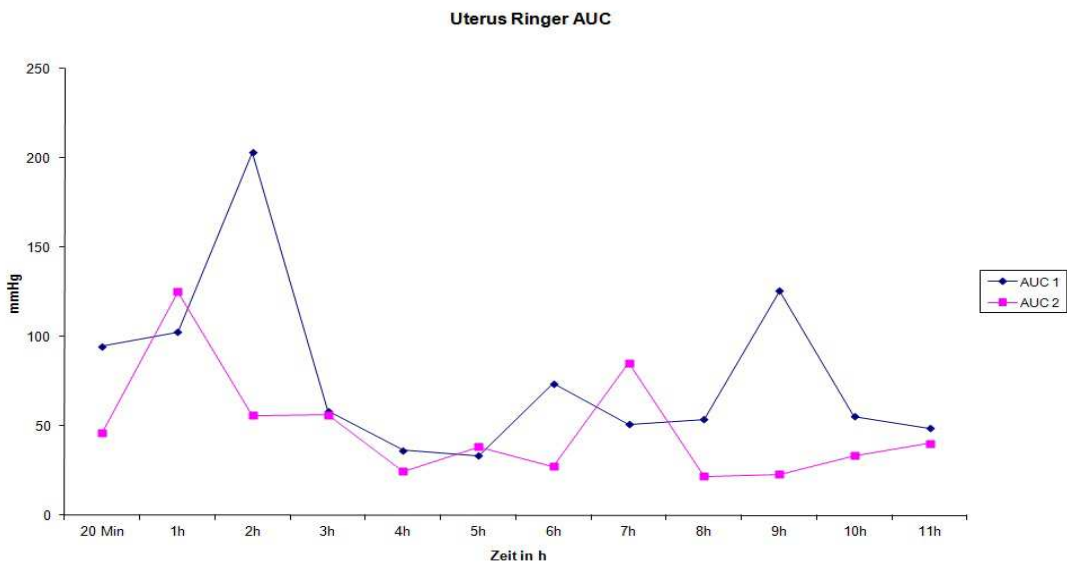


Abb. 8: Mittelwerte für das Flächenintegral AUC in mmHg (AUC 1= blau; AUC 2= magenta) im Zeitverlauf bis zu 11 h nach Perfusion mit Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung

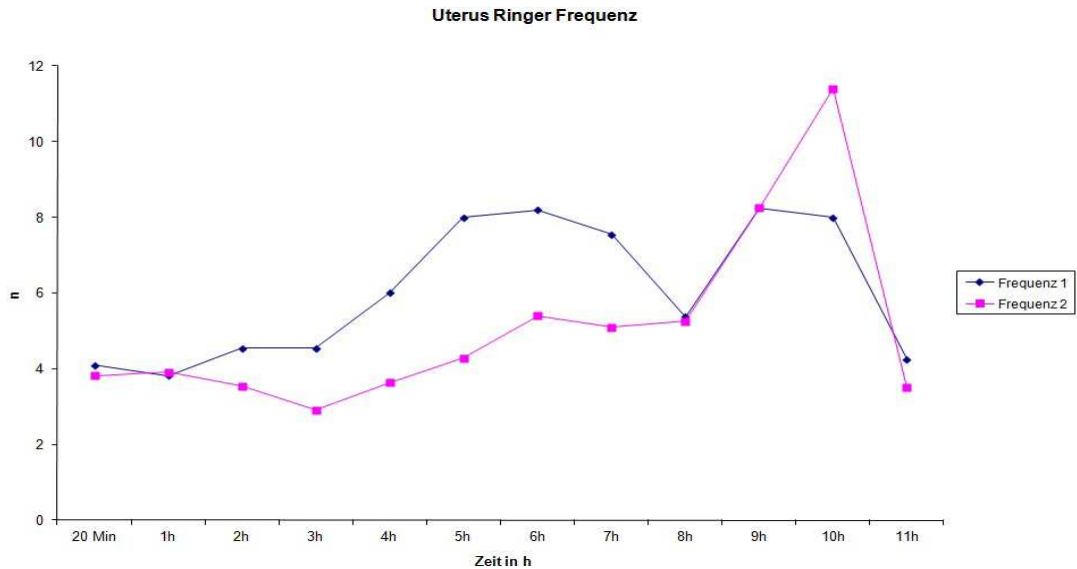


Abb. 9: mittlere Frequenz in n/Zeitintervall (F1= blau; F2= magenta) bis zu 11 h nach Perfusion mit Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung

## Gruppe 2: Modifizierte Krebs – Ringer Bikarbonat Puffer Lösung

Es wurden insgesamt 8 Uteri (n=8) mit einem mittleren Startgewicht von 147 g (70g -200g) mit der modifizierten Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung perfundiert. Bei 2 Organen wurden initial Kontraktionen mittels Oxytocin induziert. Der mittlere Druckwert für ICP 1 betrug 6,9 mmHg und für ICP 2 5,1 mmHg (Abb. 10, 16). Die mittlere AUC 1 lag bei 335,3 mmHg und die mittlere AUC 2 bei 297,4 mmHg (Abb. 11, 17). Die mittlere F1 und F2 lagen bei 8,13 und 8,19 Kontraktionen pro Zeitintervall (Abb.12, 18). Makroskopisch sichtbare Kontraktionen starteten im Mittel nach einer Latenz von 1,4 h. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 8,13 h (R= 6-11 h). Die effektive Kontraktionszeit der Organe lag im Mittel bei 6,73 h, d.h. während 83 % der Überlebenszeit fanden Kontraktionen statt (Abb. 19). Der pH-Wert lag im Mittel nach 1 h bei 7,54 und veränderte sich bis zum Ende der Perfusionszeit auf 7,0 (Abb. 20). Der mittlere Laktat- Wert stieg entsprechend von 1,7 mmol/l auf 4,6 mmol/l (Abb. 21).

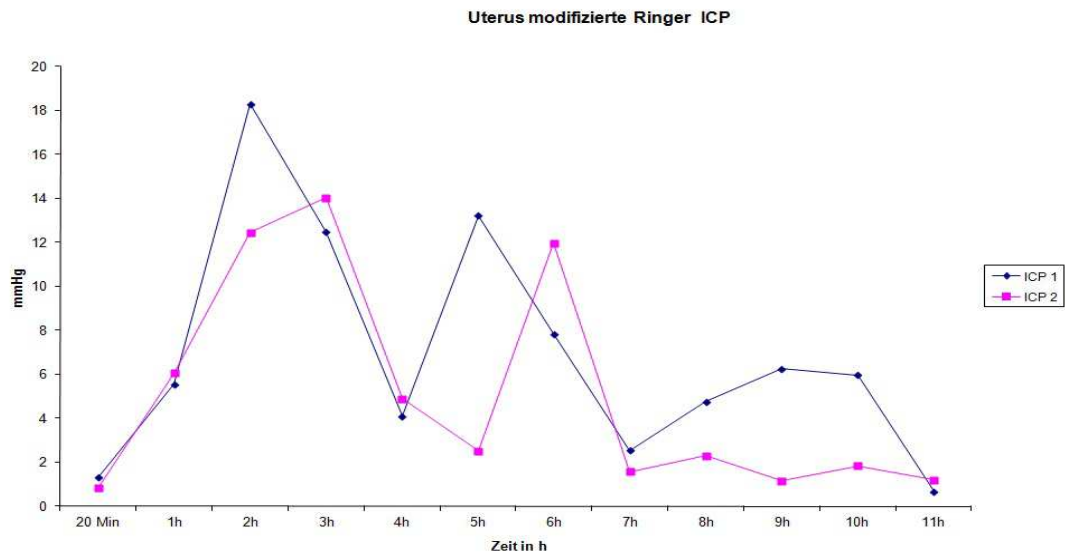


Abb. 10: mittlere Druckwerte in mmHg (ICP 1= blau; ICP 2= magenta) im Zeitverlauf bis zu 11 h nach Perfusion mit modifizierter Krebs- Ringer- Bikarbonat-Puffer Lösung

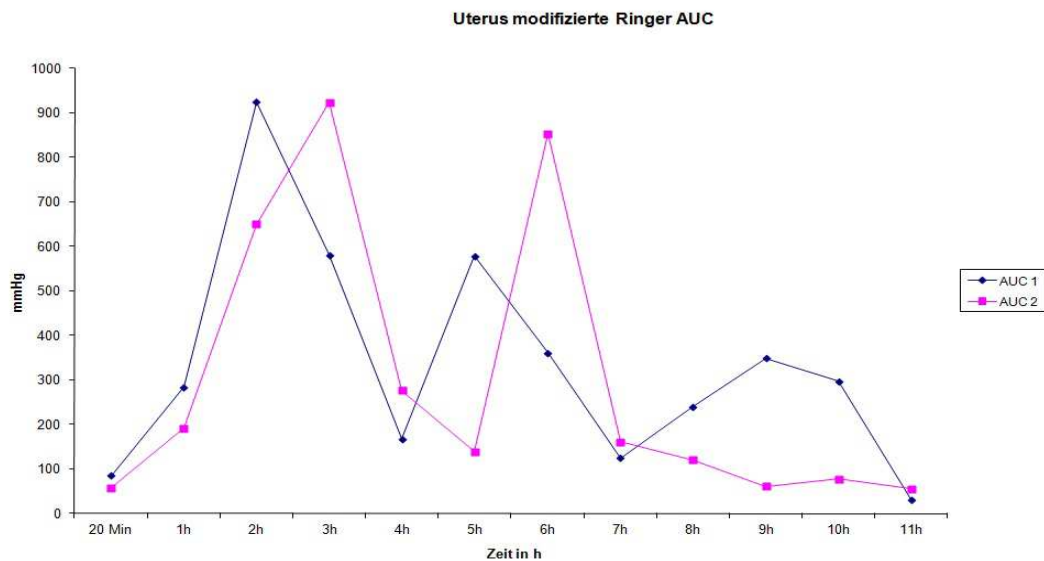


Abb. 11: Mittelwerte für AUC in mmHg (AUC 1= blau; AUC 2= magenta) im Zeitverlauf bis zu 11 h nach Perfusion mit modifizierter Krebs- Ringer- Bikarbonat-Puffer Lösung



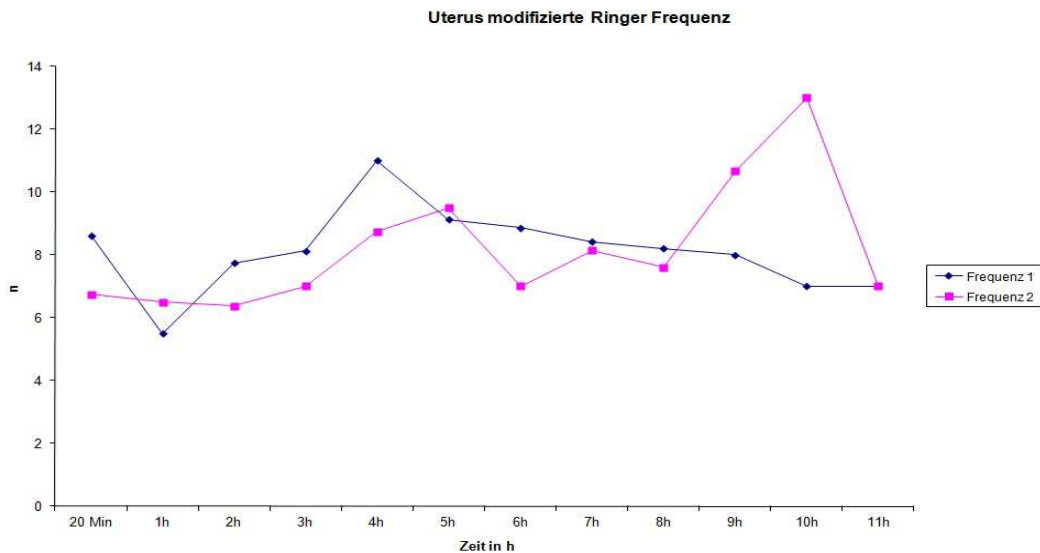


Abb. 12: mittlere Frequenz in n/Zeitintervall (F1= blau; F2 =magenta) bis zu 11 h nach Perfusion mit modifizierter Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung

### **Gruppe 3: Modifizierte Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung mit Substitution des gesamten Perfusates im Organbecken durch frisches Perfusionsmedium**

Es wurden insgesamt 11 Uteri (n=11) mit einem mittleren Startgewicht von 143,5 g (75 g -200 g) mit der modifizierten Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung (s.Tabelle 1) perfundiert und zusätzlich das angesammelte Perfusat aus dem Organbecken ca. alle 2 h vollständig durch frisches Medium ersetzt. Der mittlere Druckwert ICP 1 lag bei 9,45 mmHg und für ICP 2 bei 6,0 mmHg (Abb. 13, 16). Die mittlere AUC 1 lag bei 345,2 mmHg und AUC 2 bei 137 mmHg (Abb. 14, 17). Die mittlere F1 und F2 lagen bei 12,7 bzw. 10,2 Kontraktionen pro Zeitintervall (Abb. 15, 18). Makroskopisch sichtbare Kontraktionen waren im Mittel nach einer Latenz von 0,3 h sichtbar. Die Überlebenszeit lag bei 13,3 h (R= 10- 17 h). Die effektive Kontraktionszeit der Organe lag im Mittel bei 13 h, d.h. während 98 % der Überlebenszeit fanden Kontraktionen statt (Abb. 19). Der pH- Wert lag im Mittel nach 1 h bei 7,6 und blieb bis zum Ende der Perfusionszeit konstant bei 7,4 (Abb. 20). Der mittlere Laktat- Wert stieg von 1,27 mmol/l auf 2,0 mmol/l (Abb. 21).

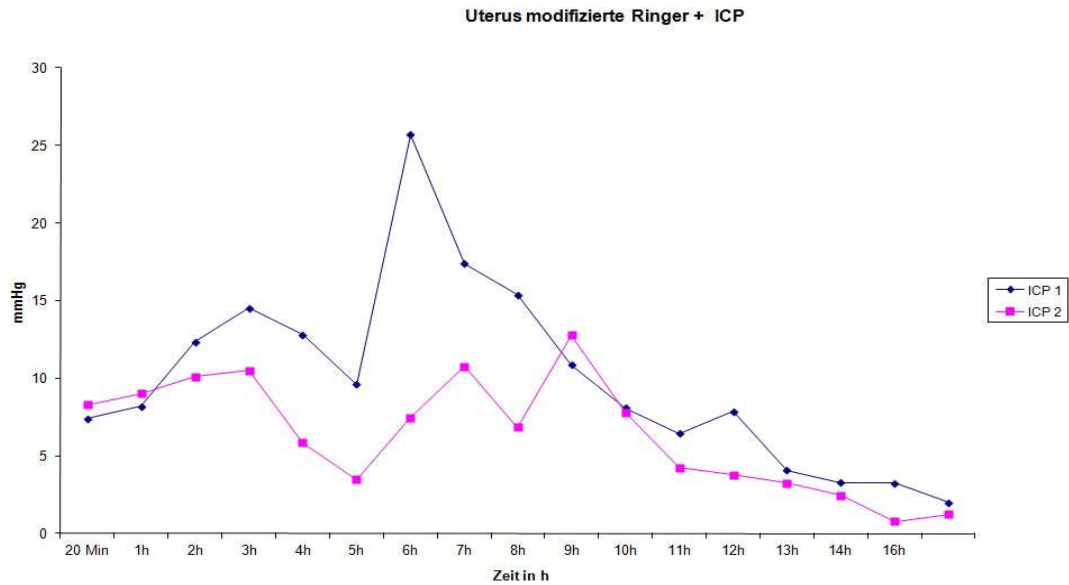


Abb. 13: mittlere Druckwerte in mmHg (ICP 1= blau; ICP 2= magenta) im Zeitverlauf bis zu 17 h nach Perfusion mit modifizierter Krebs- Ringer- Bikarbonat-Puffer Lösung und mit Substitution des gesamten Perfusates im Organbecken durch frisches Perfusionsmedium

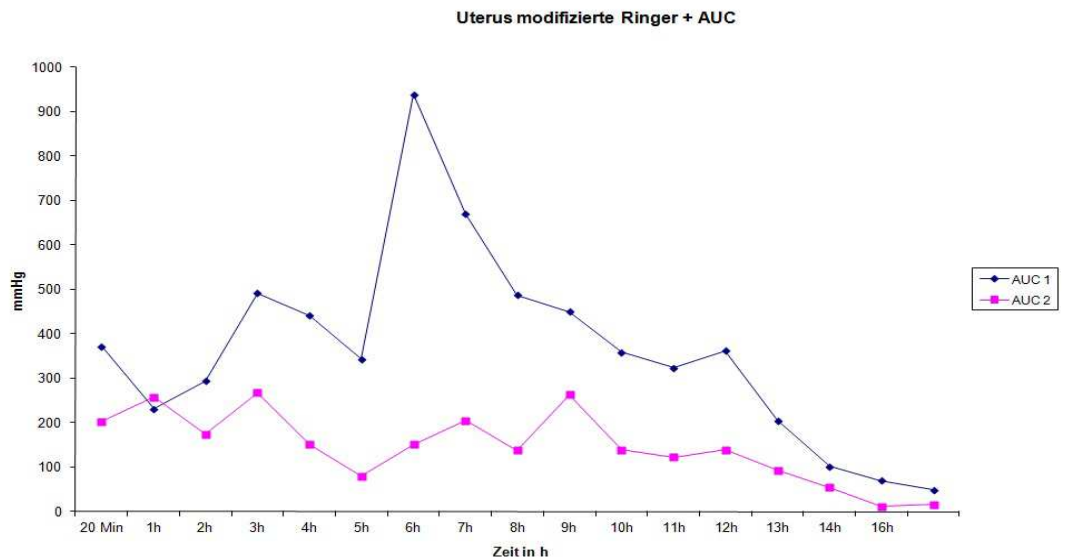


Abb. 14: Mittelwerte für AUC in mmHg (AUC 1= blau; AUC 2= magenta) im Zeitverlauf bis zu 17 h nach Perfusion mit modifizierter Krebs- Ringer- Bikarbonat-Puffer Lösung und mit Substitution des gesamten Perfusates im Organbecken durch frisches Perfusionsmedium

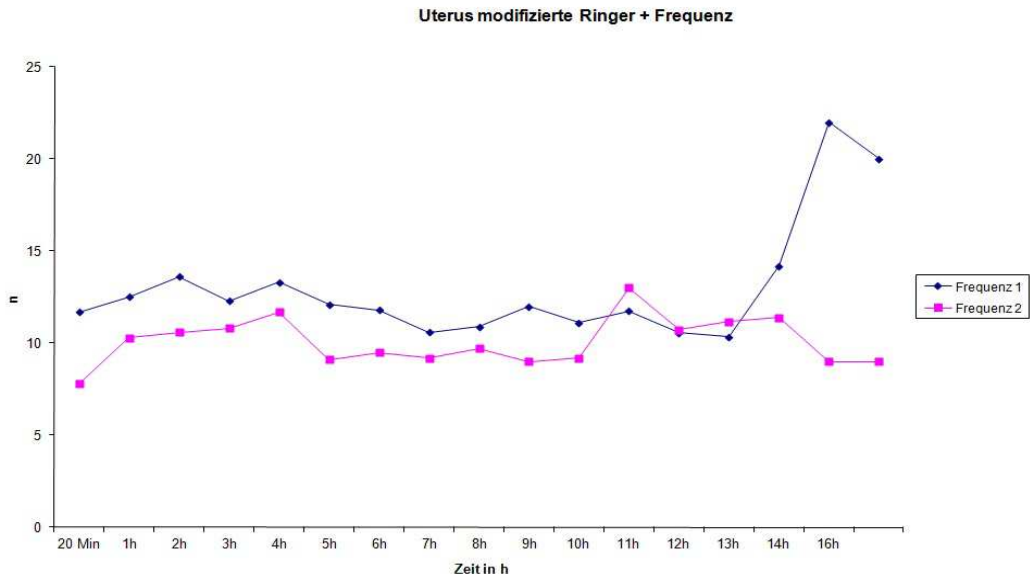


Abb. 15: mittlere Frequenz in n/Zeitintervall (F1= blau; F2= magenta) bis zu 17 h nach Perfusion mit modifizierter Krebs- Ringer Bikarbonat Puffer Lösung und mit Substitution des gesamten Perfusates im Organbecken durch frisches Perfusionsmedium

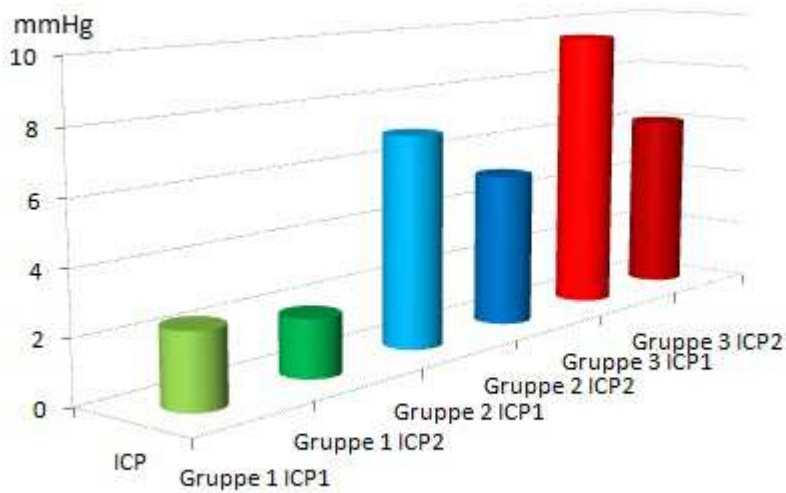


Abb. 16: Mittelwerte für ICP 1 und ICP 2 in mmHg; Gruppe 1= grün, Gruppe 2= blau, Gruppe 3= rot

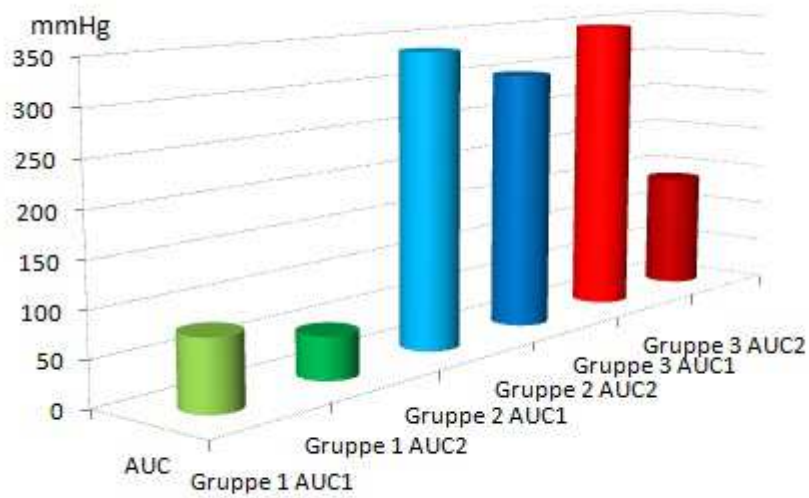


Abb. 17: Mittelwerte für AUC 1 und AUC 2 in mmHg; Gruppe 1= grün, Gruppe 2= blau, Gruppe 3= rot

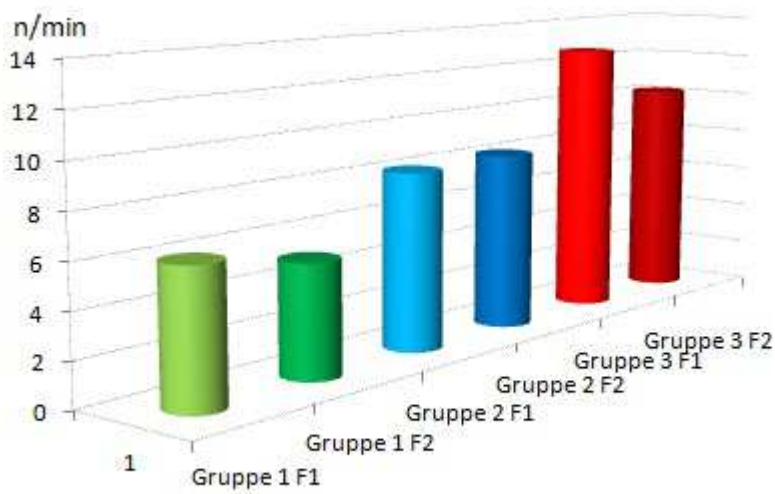


Abb. 18: Mittelwerte für die Kontraktionsfrequenz (F) in n/Zeitintervall; Gruppe 1= grün, Gruppe 2= blau, Gruppe 3= rot

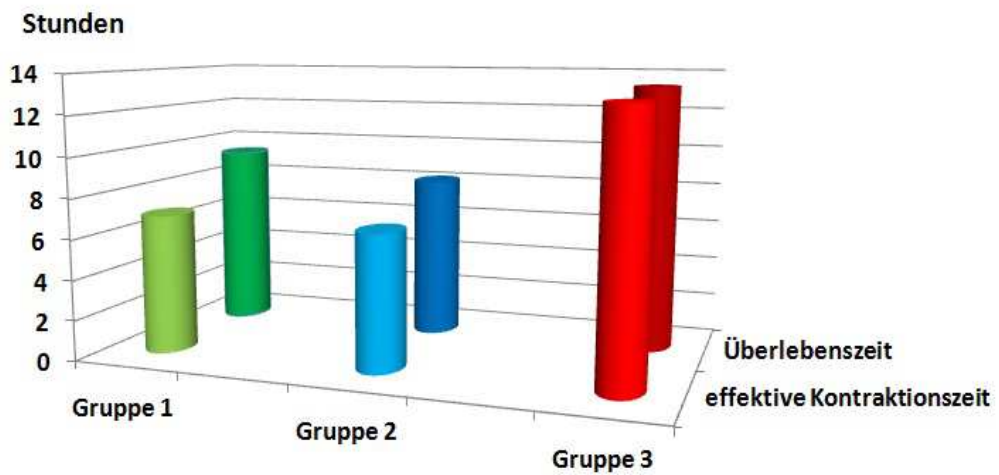


Abb. 19: Mittlere Überlebenszeit (hintere Reihe) und mittlere effektive Kontraktionszeit (vordere Reihe); Gruppe 1= grün, Gruppe 2= blau, Gruppe 3= rot

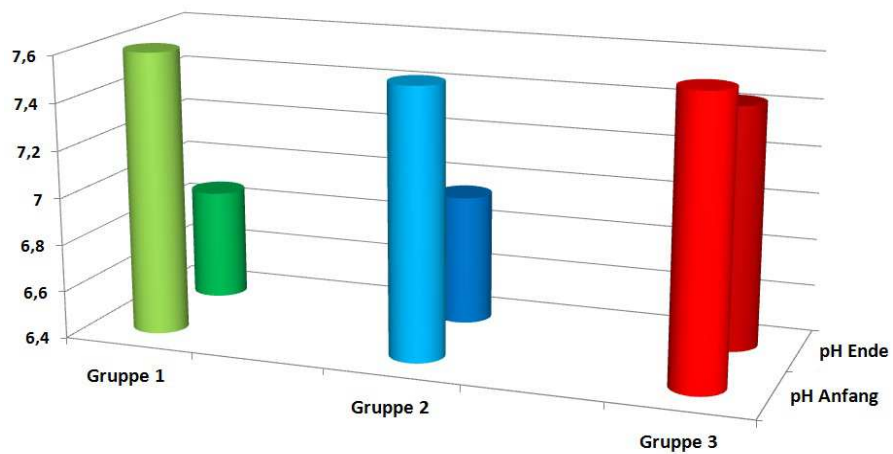


Abb. 20: pH- Mittelwerte jeweils nach 1 h Perfusion (vordere Reihe) und am Versuchsende (hintere Reihe); Gruppe 1= grün, Gruppe 2= blau, Gruppe 3= rot

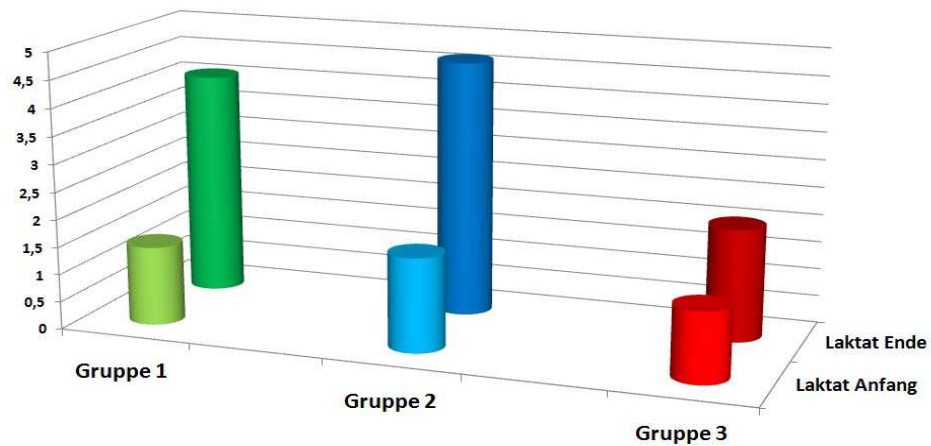


Abb. 21: Laktat Mittelwerte in mmol/l jeweils nach 1 h Perfusion (vordere Reihe) und Versuchsende (hintere Reihe); Gruppe 1= grün, Gruppe 2= blau, Gruppe 3= rot

Für Gruppe 2 und 3 zeigten sich für die Kontraktionsparameter ICP, AUC und F jeweils signifikante Unterschiede im Vergleich zur Perfusion mit der herkömmlichen Lösung in Gruppe 1 (siehe Tabelle 2). Erste rhythmische Kontraktionen konnten nach Perfusion mit der modifizierten Lösung bereits nach 1,4 h (Gruppe 2) und nach 0,3 h (Gruppe 3) beobachtet werden. Sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 2 kam es im Versuchsverlauf zu einem deutlichen Anstieg des Laktat bzw. Abfall des pH-Wertes. In Gruppe 3 konnte durch die regelmäßige Substitution des gesamten abgepumpten Perfusates mit frischem Nährmedium ein konstanter Säure- Base Haushalt aufrechterhalten werden. Dies spiegelte sich im Vergleich zu Gruppe 1 in der signifikant unterschiedlichen Laktat- und pH- Differenz wieder ( $p= 0,005$ ;  $p< 0,001$ ). Die Überlebenszeit von bis zu 17 h (Mittelwert: 13,3 h) mit einem Anteil von 98% effektiver Kontraktionszeit in Gruppe 3 unterschied sich signifikant von Gruppe 1 ( $p< 0,001$ ). Die Signifikanzniveaus im Gruppenvergleich bezüglich der untersuchten Parameter sind Tabelle 2 zu entnehmen.

	Gruppe 1 vs Gruppe 2	Gruppe 1 vs Gruppe 3	Gruppe 2 vs Gruppe 3
ICP 1	<i>p= 0,015</i>	<i>p&lt; 0,001</i>	p= 0,220
ICP 2	p= 0,073	<i>p= 0,002</i>	p= 0,397
AUC 1	<i>p= 0,002</i>	<i>p= 0,001</i>	p= 0,703
AUC 2	<i>p&lt; 0,001</i>	<i>p= 0,007</i>	p= 0,379
F 1	<i>p= 0,001</i>	<i>p&lt; 0,001</i>	<i>p&lt; 0,001</i>
F 2	<i>p&lt; 0,001</i>	<i>p&lt; 0,001</i>	p= 0,031
Laktat-Differenz	p= 0,953	<i>p= 0,005</i>	p= 0,020
pH-Differenz	p= 0,461	<i>p&lt; 0,001</i>	<i>p= 0,008</i>
Überleben	p= 0,149	<i>p&lt; 0,001</i>	p= 0,031

Tabelle 2: Gruppenvergleich im post- hoc Verfahren mit Signifikanzniveaus ( $p=0,017$ ) für die untersuchten Parameter, signifikante Werte sind kursiv und fett markiert

## 5. Diskussion:

Adäquate uterine Kontraktilität und ein intakter uterotubarer Transportprozess sind einerseits für den Transport von Samen und Gameten sowie für eine erfolgreiche spontane oder assistierte Implantation des Embryos notwendig. Andererseits kann eine inadäquate Uterusaktivität zu ektopter Schwangerschaft, Abortneigung, retrograden Blutungen und Endometriose führen (5, 6, 8, 26). Unsere Arbeitsgruppe um Dittrich et al. beschäftigt sich wie eingangs erwähnt seit 2003 mit funktionellen Untersuchungen am perfundierten Schweineuterus (19). Das offene Perfusionsmodell ermöglicht die Messung spontaner und initiiertes Kontraktionen in Corpus und Isthmus uteri über einen Double- chip Mikrokatheter. Es konnten jeweils an einer großen Stückzahl von Schweinegebärmüttern Substanzen oder Medikamente angewandt werden, z.B. Oxytocin, Tokolytika, Spasmolytika, Östrogen, Progesteron, Prostaglandine sowie Seminalplasma und deren Wirkung auf die Uterusmuskulatur untersucht werden (18, 19, 28, 30, 31, 32). Als bisheriges Perfusionsmedium diente eine standardisierte Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer Lösung, mit der eine

Versuchsdauer von maximal 8 h unter physiologischen Bedingungen möglich war (s. Tabelle 1) (19). In der Literatur wurde bereits mehrfach die Anwendbarkeit von Perfusionsmodellen zur experimentellen Untersuchung von Plazentagewebe, Ovarien und Uteri betont (4, 10, 35). In der vorliegenden Arbeit sollte das bereits beschriebene offene Perfusionsmodell weiterentwickelt werden, um zukünftig auch metabolische Rezeptor- Liganden Untersuchungen, z.B. der M<sub>3</sub>- Cholinozeptoren, in der Langzeitperfusion des Schweineuterus durchführen zu können. Der Autor stimmt mit Richter et al. (36) überein, dass Methoden zur Organkonservierung in Hypothermie nur sehr eingeschränkt zur Durchführung metabolischer Untersuchungen geeignet sind, da unter anderem eine Inaktivierung von transmembranösen Ionenpumpen resultiert. In der experimentellen und klinischen Transplantationsmedizin werden verschiedene Lösungen für die Kältekonservierung von Organen, wie z.B. die Eurocollins Lösung, University of Wisconsin- Lösung oder die Histidin- Tryptophan- Ketoglutarat- Lösung und Hypothermosol eingesetzt (2, 3, 15, 16, 22, 41). Die erfolgreiche Anwendung der Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung zur Perfusion von humanen und porcinen Uteri wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (12, 19, 36). In Anlehnung an Bulletti et al. (12) und Richter et al. (36) entschied sich der Autor für eine modifizierte Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung zur experimentellen Langzeitperfusion von Schweineuteri. Im Vergleich zu dem von Richter et al. (36) verwendeten geschlossenen Perfusionssystem mit Rezirkulation des Nährmediums, ist die offene Variante kostengünstiger. Für die Versuchsdurchführung kann auf einen Membranoxygenator und einen Inkubator verzichtet werden. Das Perfusionsmedium wird kontinuierlich oxygeniert und der Schweineuterus ist im Organbecken von Nährmedium umgeben. Das offene Perfusionssystem bestehend aus Organbecken, Rollenpumpe incl. Infusionssystem, Gasflasche und Schwenkbad sowie Soft- und Hardware ist schnell und mühelos von einer Person aufzubauen und zu bedienen. Die Verwendung von Schweineuteri für Perfusionsversuche ist wie eingangs erwähnt geeignet und die Ergebnisse sind mit humanen Verhältnissen vergleichbar. Der logistische Aufwand der Beschaffung der Schweineuteri ist im Vergleich zur Perfusion humaner Uteri deutlich geringer, dadurch kann eine höhere Stückzahl an Organen in kürzerer Zeit untersucht werden. Bei Rezirkulation des Perfusates, wie von Richter et al. (36) beschrieben, kann Perfusionsmedium gespart werden. Dennoch ist es auch bei dieser Methode nötig etwa 2 l Perfusionsmedium nach 4 h



vollständig auszutauschen (25). Bei dem vom Autor angewendeten Perfusionsmodell resultiert bei einer Flussrate von ca. 15 ml/min und der alle 2 h durchgeführten vollständigen Substitution des Beckenperfusates durch 1 l frisches Medium, ein Verbrauch von etwa 1,5 l/h. Dies entspricht einem Verbrauch an Perfusionsmedium von etwa 6 l in 4 h und somit etwa dem 3-fachen Verbrauch im Vergleich zu Richter et al. (36). Es ist zu berücksichtigen, dass ein direkter Vergleich des Verbrauchs an Perfusionsmedium zwischen humanen und porcinen Uteri auf Grund der Organgröße nur bedingt möglich ist. Der Mehrverbrauch an Perfusionsmedium ist nach Ansicht des Autors ein Nachteil des offenen Modells. Im Hinblick auf anderweitige Kostenersparnis jedoch akzeptabel. Die Herstellung der modifizierten Krebs – Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung ist kostengünstig, unkompliziert und wenig zeitaufwendig. Da eine relevante bakterielle Infektion des Organs während des Versuchs als unwahrscheinlich eingeschätzt wurde, entschied sich der Autor auf eine antibiotische Infektprophylaxe zu verzichten.

Wie bereits erwähnt konnte mit der standardisierten Krebs- Ringer Lösung bisher eine maximale Perfusionszeit von 8 h erreicht werden (19).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die Anwendung der modifizierten Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung (s. Tabelle 1) die Überlebenszeit der Schweineuteri von maximal 11 h (Gruppe 1) auf bis zu maximal 17 h (Gruppe 3) signifikant verlängert werden konnte. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Bulletti et al. (12) und Richter et al. (36) bzgl. der Langzeitperfusion von humanen Uteri, konnte das Ziel, die Vitalität der Schweineuteri für 24 h aufrecht zu erhalten, nicht erreicht werden. Jedoch scheint eine mittlere Überlebenszeit von 13,3 h in Gruppe 3, mit einer maximalen Überlebenszeit von bis zu 17 h, geeignet zu sein, um nun weiterführende metabolische und physiologische Untersuchungen am Schweineuterus durchführen zu können. Die Organphysiologie des Schweineuterus ist dem humanen Uterus zwar sehr ähnlich aber nicht identisch, was einen direkten Vergleich der Überlebenszeiten nur eingeschränkt zulässt. Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass für die signifikante Verlängerung der Überlebenszeit die Kombination aus modifiziertem Perfusionsmedium und die Substitution des gesamten Perfusates im Organbecken notwendig zu sein scheinen.

Bereits bei der Perfusion mittels modifizierter Krebs- Ringer- Bikarbonat- Puffer Lösung in Gruppe 2 konnten im Vergleich zur herkömmlichen Lösung in Gruppe 1 insgesamt signifikant bessere Kontraktionsparameter (ICP, AUC, F) beobachtet

werden (s. Tabelle 2). Darüber hinaus bewirkte die modifizierte Lösung im Vergleich zur herkömmlichen Lösung eine regelhafte Initiation spontaner Kontraktionen nach kurzer Latenz und eine deutlich längere effektive Kontraktionszeit (Abb. 19). Für die Praxis bedeutet dies, zum einen eine deutliche Zeitersparnis durch die verringerte Latenzzeit (Gruppe 1: 2,35 h vs. Gruppe 3: 0,3 h) bis zum spontanen Kontraktionsbeginn der Organe und zum anderen eine Verbesserung der Qualität der Perfusionsversuche.

Zusammenfassend konnte durch die Verwendung der modifizierten Krebs- Ringer Bikarbonat Pufferlösung in Kombination mit der Substitution des Beckenperfusates das offene Modell zur Perfusion von Schweineuteri im Hinblick auf die Überlebenszeit und die Qualität der Kontraktionsparameter der porcinen Uteri deutlich verbessert werden. Es können in Zukunft weiterführende metabolische Untersuchungen in der Reproduktionsmedizin mit geringem logistischem Aufwand und kostengünstig mit diesem Modell für die Mittel- und Langzeitperfusion unternommen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Baldan N, Toffano M, Cadrobbi R, Codello L, Calabrese F, Bacelle L, Rigotti P, (1997). "Kidney preservation in pigs using celsior, a new organ preservation solution." *Transplant Proc* 29(8): 3539-3540.
2. Bellamy CA, Nicely B, Mattice BJ, Teaster R, (2008). "Comparative analysis of clinical efficacy and cost between University of Wisconsin solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate." *Prog Transplant* 18(3): 166-171; quiz 172.
3. Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM, (2004). "Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol." *Ann Transplant* 9(2): 35-37.
4. Brannstrom, M. and S. Flaherty (1995). "Methodology and characterization of an in vitro perfusion model for the mouse ovary." *J Reprod Fertil* 105(2): 177-183.
5. Bulletti, C. and D. de Ziegler (2005). "Uterine contractility and embryo implantation." *Curr Opin Obstet Gynecol* 17(3): 265-276.
6. Bulletti C, De Ziegler D, Polli V, Del Ferro E, Palini S, Flamigni C, (2002). "Characteristics of uterine contractility during menses in women with mild to moderate endometriosis." *Fertil Steril* 77(6): 1156-1161.

7. Bulletti C, de Ziegler D, Polli V, Diotallevi L, Del Ferro E, Flamigni C, (2000). "Uterine contractility during the menstrual cycle." *Hum Reprod* 15 Suppl 1: 81-89.
8. Bulletti C, DeZiegler D, Stefanetti M, Cicinelli E, Pelosi E, Flamigni C, (2001). "Endometriosis: absence of recurrence in patients after endometrial ablation." *Hum Reprod* 16(12): 2676-2679.
9. Bulletti C, Jasonni VM, Ciotti PM, Tabanelli S, Naldi S, Flamigni C, (1988). "Extraction of estrogens by human perfused uterus. Effects of membrane permeability and binding by serum proteins on differential influx into endometrium and myometrium." *Am J Obstet Gynecol* 159(2): 509-515.
10. Bulletti C, Jasonni VM, Lubicz S, Flamigni C, Gursipide E, (1986). "Extracorporeal perfusion of the human uterus." *Am J Obstet Gynecol* 154(3): 683-688.
11. Bulletti C, Jasonni VM, Martinelli G, Govoni E, Tabanelli S, Ciotti PM, Flamigni C, (1987). "A 48-hour preservation of an isolated human uterus: endometrial responses to sex steroids." *Fertil Steril* 47(1): 122-129.
12. Bulletti C, Jasonni VM, Tabanelli S, Gianaroli L, Ciotti PM, Ferraretti AP, Flamigni C, (1988). "Early human pregnancy in vitro utilizing an artificially perfused uterus." *Fertil Steril* 49(6): 991-996.
13. Bulletti C, Prefetto RA, Bazzocchi G, Romero R, Mimmi P, Polli V, Lanfranchi GA, Labate AM, Flamigni C., (1993). "Electromechanical activities of human uteri during extra-corporeal perfusion with ovarian steroids." *Hum Reprod* 8(10): 1558-1563.

14. Carsten E.M., M. J. D. (1989). Uterine Functions. Molecular and Cellular Aspects. New York, London, Plenum Press
15. Collins, G. M. (1997). "What solutions are best? Overview of flush solutions." *Transplant Proc* 29(8): 3543-3544.
16. Collins, G. M. and W. N. Wicomb (1992). "New organ preservation solutions." *Kidney Int Suppl* 38: S197-202.
17. Diedrich (2000). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag.
18. Dittrich R, Henning J, Maltaris T, Hoffmann I, Oppelt PG, Cupisti S, Beckmann MW, Mueller A, Kiesewetter F, (2011). "Extracorporeal perfusion of the swine uterus: effect of human seminal plasma." *Andrologia*.
19. Dittrich R, Maltaris T, Müller A, Dragonas C, Scalera F, Beckmann MW, (2003). "The extracorporeal perfusion of swine uterus as an experimental model: the effect of oxytocic drugs." *Horm Metab Res* 35(9): 517-522.
20. Drenckhahn D, Z. W., Benninghoff (1994). *Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. München, Wien, Baltimore, Urban & Schwarzenberg.
21. Gay R, R. A., Klinker R, Silbernagl S (2005). *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart, Thieme.
22. Hrabalová M, Bachleda P, Lubuská L, Kojecký Z, Zadrazil J, Krejčí K, Al Jabry S, (2003). "Effect of various protective solutions on function after

kidney transplantation." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147(2): 197-202.

23. Iwasaki S, Araki H, Miyauchi Y, Nishi K, (1991). "24-hour preservation of isolated rat hearts perfused with pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (PHP) solution at low temperature." *Artif Organs* 15(2): 78-85.
24. Kamada N, Calne RY, Wight DG, Lines JG, (1980). "Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion." *Transplantation* 30(1): 43-48.
25. Kim SY (2005). *Extrakorporale Uterusperfusion zur Untersuchung von Uterotonika in der Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin.* Bonn. <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2006/0687/0687.htm>
26. Kissler S, Siebzehnuebl E, Kohl J, Mueller A, Hamscho N, Gaetje R, Ahr A, Rody A, Kaufmann M, (2004). "Uterine contractility and directed sperm transport assessed by hysterosalpingoscintigraphy (HSSG) and intrauterine pressure (IUP) measurement." *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica* 83(4): 369-374.
27. Knobil E, N. L. (1994). *The Physiology of Reproduction.* New York, Raven Press, LTD.
28. Künzel J, Geisler K, Hoffmann I, Müller A, Beckmann MW, Dittrich R, (2011) "Myometrial response to neurotropic and musculotropic spasmolytic drugs in an extracorporeal perfusion model of swine uteri." *Reprod Biomed Online* 23(1): 132-140.

29. Maltaris T, Dragonas C, Hoffmann I, Mueller A, Schild RL, Schmidt W, Beckmann MW, Dittrich R, (2006). "The extracorporeal perfusion of the swine uterus as an experimental model: The effect of tocolytic drugs." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 126(1): 56-62.
30. Mueller A, Maltaris T, Siemer J, Binder H, Hoffmann I, Beckmann MW, Dittrich R, (2006). "Uterine contractility in response to different prostaglandins: results from extracorporeally perfused non-pregnant swine uteri." *Hum Reprod* 21(8): 2000-2005.
31. Mueller A, Siemer J, Renner S, Hoffmann I, Maltaris T, Binder H, Beckmann MW, Dittrich R, (2006). "Perfused non-pregnant swine uteri: a model for evaluating transport mechanisms to the side bearing the dominant follicle in humans." *J Reprod Dev* 52(5): 617-624.
32. Mueller A, Siemer J, Schreiner S, Koesztner H, Hoffmann I, Binder H, Beckmann MW, Dittrich R, (2006). "Role of estrogen and progesterone in the regulation of uterine peristalsis: results from perfused non-pregnant swine uteri." *Hum Reprod* 21(7): 1863-1868.
33. Nusslag (1968). *Lehrbuch der Anatomie und Physiologie der Haustiere*. Leipzig, S. Hirzel Verlag.
34. Ohura H, Kondo T, Handa M, Saito R, Matsumura Y, Okada Y, Shimada K, Hirose M, Horikoshi A, Sugita M, (1995). "Functional and histopathologic studies of primate pulmonary allografts preserved for 24 hours with a form of modified extracellular solution." *J Heart Lung Transplant* 14(3): 493-504.

35. Page, K. R. (1991). "Perfusion of isolated human placenta." *Proc Nutr Soc* 50(2): 345-347.
36. Richter O, Wardelmann E, Dombrowski F, Schneider C, Kiel R, Wilhelm K, Schmolling J, Kupka M, van der Ven H, Krebs D, (2000). "Extracorporeal perfusion of the human uterus as an experimental model in gynaecology and reproductive medicine." *Hum Reprod* 15(6): 1235-1240.
37. Rohen J, L.-D. E. (2000). *Funktionelle Histologie*. Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH.
38. Samouilides (1993). *Physiopathologie der Reproduktion und artifizielle Insemination im Schwein*. Thessaloniki.
39. Schmidt R, T. G. (1997). *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag.
40. Silbernagl S, D. A. (2003). *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart, Thieme.
41. Southard, J. H. and F. O. Belzer (1995). "Organ preservation." *Annu Rev Med* 46: 235-247.
42. Spätling L, F. F. (1993). *Bolustokolyse in Theorie und Praxis*. Darmstadt, Steinkopff Verlag.
43. Toledo-Pereyra, L. H. (1982). "Pulsatile perfusion is still indicated for kidney preservation." *Transplantation* 34(2): 110.



44. van der Wijk J, Slooff MJ, Rijkmans BG, Kootstra G, (1980). "Successful 96- and 144-hour experimental kidney preservation: a combination of standard machine preservation and newly developed normothermic ex vivo perfusion." *Cryobiology* 17(5): 473-477.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
A.:	Ampere
Abb.:	Abbildung
AG:	Aktiengesellschaft
AUC:	Area under the curve
bzgl:	bezüglich
bzw.:	beziehungsweise
CaCl + 2 H <sub>2</sub> O:	Calciumchloriddihydrat
CaCl <sub>2</sub> +6H <sub>2</sub> O:	Calciumdichlorat- Hexahydrat
cm:	Zentimeter
CO <sub>2</sub> :	Kohlendioxid
d.h.:	das heißt
F:	Frequenz
Fa.:	Firma
FSH:	Follikel- stimulierendes Hormon
G:	Gauge
g:	Gramm
Glukose + H <sub>2</sub> O:	Glukosemonohydrat
GnRH:	Gonadotropin- releasing hormon
h:	Stunde
HVL:	Hypophysenvorderlappen
ICP 1:	distaler Messpunkt des Double- chip Microkatheters
ICP 2:	proximaler Messpunkt des Double- chip Microkatheters
IE/l:	Internationale Einheit/Liter
Int.:	international
IU/l:	International Unit/Liter
KCL:	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Kaliumdihydrogenphosphat
l:	Liter
LH:	luteinisierendes Hormon
M <sub>3</sub> :	muskarinerg
MgCl <sub>2</sub> :	Magnesiumdichlorid

MgSO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O:	Magnesiumsulfat-Monohydrat
min:	Minute
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mmHg:	Millimeter Quecksilbersäule
mmol:	millimolar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl:	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O:	Natriumdihydrogenphosphat- monohydrat
NaHCO <sub>3</sub> :	Natrium- Bikarbonat
ng/ml:	Nanogramm/Milliliter
NO:	Stickstoff
O <sub>2</sub> :	Sauerstoff
p:	Signifikanzniveau
pg/ml:	Pikogramm/ Milliliter
R:	Range
s:	Sekunde
Tab.:	Tabelle
V:	Volt
vs:	versus
z. B.:	zum Beispiel
ZVD:	zentraler Venendruck

## **8. Danksagung**

Für die Ermöglichung dieser Promotionsarbeit an der Frauenklinik der Universität Erlangen- Nürnberg in der Abteilung für Endokrinologie und Reproduktionsmedizin möchte ich dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Matthias W. Beckmann, herzlich danken.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Ralf Dittrich, für die Bereitstellung des Themas und hervorragende Einführung sowie seine stetige Förderung und kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Team des endokrinologischen sowie molekularmedizinischen Labors und insbesondere bei Frau Inge Hoffmann für Ihre großartige menschliche, ideenreiche und organisatorische Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Außerdem danke ich meinen Vorgängern im Doktorandenteam, insbesondere Herrn Dr. Julian Künzel, für die wissenschaftlichen Vorlagen zu meiner Arbeit, die technische Hilfestellung und die Einführung in die Laborarbeit.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Herrn Philipp Grundtner für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für Ihre stetige Unterstützung.

## 9. Lebenslauf

**Kontaktdaten:** Klaudija Geisler  
Nördliche Stadtmauerstr. 8  
91054 Erlangen

**Persönliche Daten:** Geboren am 23.12.1978 in Fürth  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: römisch- katholisch  
Familienstand: geschieden

**Studium:** Seit 04/2004 Medizinstudium an der Friedrich-Alexander  
Universität Erlangen- Nürnberg  
Staatsexamen im Sommersemester 2011

**Praktisches Jahr:** 1. Terial: Frauenklinik des Universitätsklinikums Erlangen  
2. Terial: Chirurgische Klinik des Universitätsklinikums  
Erlangen  
3. Terial: Medizinische Klinik 4 des Universitätsklinikums  
Erlangen

**Berufserfahrung:** Seit 09/2011 Anstellung als Assistenzärztin in der Frauenklinik  
des Universitätsklinikums Erlangen  
  
Von 10/2001 bis 08/2011 Beschäftigung als Krankenschwester  
auf der internistischen und chirurgischen Intensivstation des  
Klinikums Fürth

**Berufsausbildung:** 10/1998 bis 10/2001 Ausbildung zur examinierten  
Krankenschwester

**Schulbildung:** 1989-1998 Helene-Lange Gymnasium Fürth  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife  
1985-1989 Maischule Fürth (Grundschule)