

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell und Studiendesign

2.1.1 Tiermodell

In den Versuchsreihen dieser Studie wurde ausschließlich mit männlichen Tieren aus dem MWF- und Wistar-Stamm gearbeitet. Es fand eine Einteilung in sechs Gruppen statt, von denen in jedem Tierstamm jeweils eine Gruppe einer 5/6-Nephrektomie unterzogen wurde. Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen wurden außerdem Ausgangsblutdruckwerte stammbezogen für die MWF- und Wistar-Tiere ermittelt.

Eine Gruppe jedes Stammes wurde nur einer Simulations-Operation ohne echte Nephrektomie zugeführt, was einer sogenannten „sham“- (engl.) Operation entspricht. Postoperativ wurde dann aus jedem Stamm jeweils eine Gruppe mit Ramipril behandelt.

Die Operation (OP) wurde in der zwölften Lebenswoche (+/- eine Woche) durchgeführt. Nach weiteren vier Wochen wurden der Blutdruck, Albuminurie, Proteinurie und Kreatininwerte bestimmt, anschließend erfolgten die Organentnahme und die Tötung.

Als Kontrollstamm wurden nierengesunde, normotensive, männliche Wistar-Ratten verwendet. Diese sind weit reichend als Referenzstamm bei Versuchen mit MWF-Tieren üblich und zeigen in anderen Studien im Alter von 12-14 Wochen eine Normotonie und Proteinuriewerte im Normalbereich.^{36, 70, 94} Da der MWF-Stamm eine Subpopulation des Wistar-Stammes darstellt und somit die genetischen Unterschiede klein gehalten sind, eignen sich Wistar-Tiere gut als Kontrollgruppen bei Versuchen mit Tieren des MWF-Stammes.

2.1.2 Tiergruppen im Studiendesign

Die Tiere wurden in der 12.-13. Lebenswoche in den Versuch eingeschlossen. Das Körpergewicht betrug dabei durchschnittlich 298 ± 2 g.

Beide Tierstämme wurden jeweils in drei Gruppen eingeteilt:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Gruppe: MWF+Nx, ohne Behandlung mit Ramipril | →MWF-Nx |
| 2. Gruppe: MWF+Nx, mit postoperativer Ramipril- (Rami-) Gabe | →MWF-Nx-Rami |
| 3. Gruppe: MWF+ Simulations-OP, d.h. Kontroll- (Ko-) gruppe | →MWF-Ko |

Analog erfolgte die Einteilung für die Tiere des Wistar-Stammes:

1. Gruppe: Wistar + Nx, ohne Behandlung mit Ramipril →Wistar-Nx
2. Gruppe: Wistar + Nx, mit postoperativer Ramipril- (Rami-) Gabe →Wistar-Nx-Rami
3. Gruppe: Wistar + Simulations-OP, d.h. Kontrollgruppe →Wistar-Ko

Die Gruppengröße betrug pro Gruppe ca. 14 Tiere. Die Abkürzungen der soeben erläuterten Gruppeneinteilung wird im weiteren Text, sowie in den Abbildungen verwendet.

2.2 Tierstamm und Haltung

Die Haltung der MWF-Ratten als Hauptstamm und der Wistar-Ratten als Kontrollgruppen erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Die durchgeführten Eingriffe an den Tieren geschahen unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und der Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin. Die Genehmigung erteilte das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Nummer G 0093 / 01 vom 06.07.2001.

Die MWF-Ratten wurden eigens für Tierversuche im FEM gezüchtet. Der Stamm wurde 1996 am damaligen Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durch Inzucht etabliert.⁶⁴ Die Tiere stammten dabei ursprünglich aus der MWF-Kolonie des zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover (Ztm).

Zwischen zwei und fünf Ratten wurden jeweils gemeinsam in Makrolon-Gemeinschaftskäfigen gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter (normales Haltungsfutter) und Wasser. Im Tierstall herrschten Temperaturen von 22 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 %. Der zwölfstündige Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine automatisierte künstliche Beleuchtung aufrechterhalten.

Die Blutdruckmessungen und Operationen an den Tieren wurden ebenfalls in den Räumen des FEM durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Katheteruntersuchung im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit sowie die Tötung und Organentnahme der

Tiere in den Laborräumen der Klinischen Pharmakologie. Hierfür wurden die Tiere kurzfristig aus dem FEM in den Tierstall dieses Instituts verbracht.

2.3 Operationsmodell

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, sollte in diesem Rattenmodell bald nach der Operation ein chronisches Nierenversagen entstehen, wozu die Tiere zu 5/6 nephrektomiert wurden.

Die 5/6-Nephrektomie wurde durch die vollständige Entfernung der rechten Niere, inklusive manueller Ligatur von ein bis zwei Ästen der linken Arteria renalis (A. renalis) erreicht. Die recht konstanten anatomischen Gegebenheiten ermöglichten diese schnelle und nur mit sehr geringen Blutverlusten begleitete Operationsmethode.

2.3.1 Vorbereitung der Operation und Narkose der Tiere

Wie bereits erwähnt, wurde die Operation im Alter von zwölf Wochen durchgeführt. Wegen des hohen Zeitaufwands der Methode wurde ein Abweichen des Alters von bis zu einer Woche akzeptiert. Vor der jeweiligen Operation wurden die Tiere aus den Gemeinschaftskäfigen in Einzelkäfige umgesetzt, in den OP-Vorbereitungsraum transportiert, gewogen, narkotisiert und am äußeren Abdomen großflächig rasiert.

Die Vollnarkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Ketanest S 25 in einer Dosis von 0,174 mg pro 100 g Körpergewicht (KG) plus Xylazin 2 % mit 0,065 mg pro 100 g KG. Bis zum Erreichen der vollen Narkosetiefe wurden die Tiere in Einzelkäfige zurückgesetzt. Gegebenenfalls mussten die Narkotika in niedrigerer Dosierung intraoperativ nachappliziert werden.

Während des Narkosevorganges wurde das Operationsbesteck in einer 70 %igen Alkohollösung eingeweicht und keimreduziert auf einer ebenso keimarmen Unterlage operationsgerecht hergerichtet. Ungefähr zehn Minuten nach der Injektion erreichte die Narkose eine Tiefe, bei der die Tiere für die Operation vorbereitet werden konnten. Zunächst erfolgte dann eine Rasur mit einem elektrischen Haartrimmer. Die Tiere wurden danach in den Operationsraum gebracht und in Rückenlage auf dem OP-Tisch an den Pfoten untraumatisch fixiert. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde den Tieren eine kleine Menge panthenolhaltige Augensalbe appliziert. Ein leichtes Herausziehen der Zunge ermöglichte eine unbehinderte Spontanatmung in

Raumluft. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch einen Schmerzreiz an einer Pfote wurde der rasierte Bauch mit einer Jodlösung desinfiziert. Die Dokumentation erfolgte für jedes Tier mit Nummer, Gewicht und Alter pro Gruppe in einer Liste.

2.3.2 Operation und Technik der 5/6-Nephrektomie

Die rasierte und desinfizierte Bauchdecke wurde durch einen median geführten Schnitt eröffnet. Nach Durchtrennung der Haut und Darstellung der oberflächlichen Körperfazie erfolgte ein zweiter, ca. 4 cm langer Schnitt durch Bauchmuskulatur und Peritoneum zur Eröffnung der Bauchhöhle. Teile des Darms und Magens sowie der Milz und Leber wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens nach lateral und cranial verdrängt und mit einem stumpfen Haken fixiert. Diese Verlagerung ermöglichte eine gute Übersicht über die anatomischen Gegebenheiten der Nierenlager.

Begonnen wurde mit der Arterienligatur auf der linken Körperseite. Ziel war es, bei der Ligatur ein bis zwei Äste der Arteria renalis sinister abzubinden, sodass makroskopisch eine Nekrose von 2/3 der linken Niere erkennbar wurde. Zu der A. renalis sinister bestand ein besserer Zugang, als zur rechtsseitigen A. renalis, da sie einen längeren Gefäßast aufweist als die der rechten Körperseite, wo zudem die Leber zusätzliche Schwierigkeiten bereitet hätte.

Hilusnah wurde für die Ligatur das Peritoneum parietale um 1-2 mm inzidiert, anschließend wurden Vena renalis (V. renalis) und A. renalis von Peritoneum und Fettgewebe befreit.

In der Regel teilte sich die A. renalis dichotom in einen ventralen und einen dorsalen Ast. Durch ein kurzzeitiges Abklemmen des ventralen Astes der A. renalis wurde das anämische Nierengewebe sofort hell ischämisch und es konnte abgeschätzt werden, ob die Ligatur dieses Gefäßes ausreichte, um 2/3 des Nierengewebes untergehen zu lassen. Durch Unterstechung und Ligatur des gewählten Arterienastes mit Hilfe von nadelhaltigem, dünnem Nahtmaterial, wurde die Blutversorgung unterbrochen. Dabei wurde das damit infarzierte Nierengewebe schnell dunkellivide, sodass eine intraoperative Kontrolle des Operationserfolges möglich war. Die Fäden wurden chirurgisch verknotet und kurz abgeschnitten. In den meisten Fällen reichte diese einzelne Ligatur aus, um ca. 2/3 des linken Nierengewebes von der arteriellen Blutversorgung zu trennen. War dies aus anatomischen Besonderheiten nicht der Fall, wurden durch die kurze Abklemmung mittels einer Pinzette andere Äste des ventralen

Teils der A. renalis zur Ligatur gewählt, sodass eine Ischämie von 2/3 des Nierengewebes erkennbar wurde.

In wenigen Fällen musste hierbei entweder zusätzlich ein weiterer, kleinerer Seitenast unterbunden werden oder es konnte auf zwei kleine Abzweigungen des ventralen Astes der A. renalis zurückgegriffen werden, wenn die Ligatur derselben zu einem zu ausgedehnten Infarkt geführt hätte. Auf diese Weise wurde die gewünschte Reduktion des Nierengewebes nun dennoch erreicht. Nach nochmaliger Kontrolle des ischämischen Bereiches konnte dann die OP an der linken Niere abgeschlossen werden.

Als nächstes erfolgte die vollständige Entnahme der rechten Niere. Durch die zuvor beschriebene Verdrängung der Bauchorgane wurde das rechte Nierenlager freigelegt. Ureter und Nierenhilus wurden von Peritoneum und Fettgewebe befreit. Die Niere wurde mit Hilfe des Wattestäbchens aus ihrem Lager präpariert. Die Nebenniere wurde dabei erhalten. Rechter Ureter, Vena und Arteria renalis wurden mit einer gebogenen Pinzette umstochen und mit Handseide ligiert. Um das Risiko einer letalen Blutung zu minimieren, wurde eine zweite Ligatur medial zur ersten gesetzt. Außerdem wurde die Leber sowie der rechte Nervus femoralis geschont. Die Niere wurde mit einer Pinzette gegriffen und die großen Gefäße sowie der Ureter lateral der Ligatur mit einer Präparierschere durchtrennt. Nach Kontrolle der Gefäßstümpfe und erneuter Begutachtung des kontralateralen OP-Gebietes konnte die Reduktion des Nierengewebes abgeschlossen werden.

Während der Operation musste auch dafür gesorgt werden, dass die Bauchorgane nicht austrockneten, indem ggf. einige Tropfen sterile, physiologische Kochsalzlösung darauf appliziert wurden.

Die Schließung der Bauchhöhle erfolgte mittels einer fortlaufenden Naht durch Peritoneum und Bauchmuskulatur. Hierfür wurde resorbierbares Nahtmaterial gewählt. Die Haut wurde intrakutan genäht, um eine Eröffnung der Wunde durch das Tier zu vermeiden. Über den letzten, als einzig zugänglichen Knoten wurde ein kleiner Hautlappen genäht. Keines der Tiere eröffnete sich je die Wunde. Die verschlossene Bauchdecke wurde gereinigt und das Tier in einen angewärmten und mit Zellstoff ausgepolsterten Käfig gelegt.

Postoperativ befanden sich mindestens zwei, maximal fünf Tiere in einem der Gemeinschaftskäfige. Die aufwachenden Tiere hatten sofort Zugriff zu Trinkwasser und Futter. Zur Analgesie in den ersten drei postoperativen Tagen wurde das Trinkwasser mit Paracetamol 20 mg/kg KG versetzt. In der Regel erholten sich die Tiere sehr schnell von diesem invasiven Eingriff. Zur Minimierung einer Wundinfektion wurde in den ersten zwei postoperativen Tagen die Zellstoffauslegung des Käfigs belassen. Danach erfolgte die Haltung wie präoperativ.

2.4 Postoperative Verabreichung der Medikamente

2.4.1 Verabreichung des ACE-Hemmers Ramipril

Die Gruppe MWF-Nx-Rami und die Gruppe Wistar-Nx-Rami erhielten jeweils eine postoperative Medikation mit Ramipril. Direkt nach der Operation wurde das Trinkwasser der Tiere mit wasserlöslichem Ramipripulver versetzt. Die Tagesdosis betrug 1 mg/kg KG. Die Lösung wurde bis zum Tag der Tötung alle zwei Tage erneuert.

2.5 Vorgehen nach der OP, Blutdruckmessung und Uringewinnung

Das Sozialverhalten, Verlangen nach Wasser und Futter und die allgemeine Aktivität ließen eine Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere zu. Tägliche Kontrollen gewährleisteten das frühzeitige Erkennen einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes einzelner Tiere. In der vierten postoperativen Woche wurden bei allen Gruppen die im Folgenden dargestellten Untersuchungen durchgeführt.

2.5.1 Systolische Blutdruckmessung

Die Messungen wurden am wachen Tier mittels Schwanzplethysmografie, nicht invasiv durchgeführt. Es handelte sich um eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik mit einem Blutdruckmessgerät der Firma TSE Bad Homburg. Einzelnen wurden die Tiere in einen vorgewärmten Restraint, einen röhrenartigen Metallkäfig, gebracht, aus dem lediglich der Schwanz herausragte. In dieser Konstruktion kam das Tier nun in einen vorgewärmten Behälter und nach 30 Minuten Aufwärmphase, bei 38 °C, konnte eine Blutdruckmanschette und ein Transducer am Schwanz des Tieres angebracht werden.

Zur Gewöhnung an diese Bedingungen wurden die Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen durch denselben Untersucher, unter gleichen Bedingungen und zu

möglichst ähnlicher Tageszeit durchgeführt. Es erfolgten jeweils drei Messungen. In jeder Messung wurden zwei Werte für den systolischen Blutdruck bestimmt, wobei daraus als Ergebnis einer Messung der Mittelwert gebildet wurde. Die Daten der Messungen wurden dann auf einen Computer übertragen und pro Individuum gemittelt.

2.5.2 Uringewinnung im Stoffwechselkäfig

Ebenfalls in der vierten postoperativen Woche wurde ein 24-Stunden-Urin gewonnen. Hierzu mussten die Tiere über 24 Stunden in einen Stoffwechselkäfig gesetzt werden. In diesem Käfig hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Der ausgeschiedene Urin wurde darin vom Kot getrennt und in ein Glasgefäß abgefüllt. Die Bestimmung des Volumens erfolgte durch Auswiegen: 1 g Urin ~ 1 ml Urin. Nach der Entnahme aus dem Stoffwechselkäfig wurde ca. 1 ml Urin in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß dekantiert, welches dann bei 900 Upm für zehn Minuten zentrifugiert wurde, um eventuelle Verunreinigungen der Urinproben zu entfernen. Zur Aufbewahrung wurde der restliche Urin in Kunststoffgefäße gegeben und bei -20 °C gelagert.

2.6 Biochemische Analysen

2.6.1 Albuminbestimmung

Die Messung der Albuminurie erfolgte über eine direkte Bestimmungsmethode, einen „enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (ELISA). Die Methode wurde im Institut für Klinische Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, etabliert.

Der ELISA, bei dem eine Farbreaktion katalysiert wird, wodurch das Albumin photometrisch bestimmt werden kann, findet in einer 96-Loch Mikrotiterplatte statt. Hierzu wurden 100 µl des albuminspezifischen Antikörpers („Coating-Lösung“) pro Loch in die Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Platte: Drei Stunden bei 37 °C und 15 Stunden bei 4 °C. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurde die Platte in Folie gewickelt. Nach der Inkubation wurde die Coating-Lösung aus der Platte ausgeklopft, danach wurde sie für vier Minuten mit 100 µl Pufferlösung (Puffer A) pro Loch bei 600 Upm auf einem Mikrotiterplattenschüttler gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt und die Pufferlösung zwischendurch jeweils ausgeklopft.

40 µl der Urinproben wurden nun mit Puffer A verdünnt und zwar je nach der zu erwartenden Albuminkonzentration auf 1:50, 1:500, 1:5000 und 1:20.000.

Pro Loch wurden dann 50 µl Puffer A als Leerwert und 50 µl Standard- bzw. Urinprobenverdünnungen jeweils als Doppelbestimmung in die Platte pipettiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl Rattenantikörper pro Loch, welches den zweiten Antikörper im ELISA enthält. Die Mikrotiterplatte wurde dann eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach musste der Inhalt der Platte erneut ausgeklopft und die Platte wie zuvor beschrieben vier Minuten mit Puffer A gewaschen werden, dieses Mal erfolgten vier Waschvorgänge.

Für die Farbreaktion wurden 200 µl Substratlösung pro Loch in die Platte gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 15 Minuten auf dem Mikrotiterplattenschüttler bei 600 Upm geschüttelt. Durch 50 µl Schwefelsäure pro Loch konnte die Farbreaktion gestoppt werden. Die Farbreaktion, bei der ein blauer Farbkomplex entstand, ist invers, das heißt, eine geringere Blaufärbung zeigt höhere Albuminwerte und eine stärkere Blaufärbung niedrigere Albuminwerte an. Nun erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte mittels eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm.

Für die Bestimmung des Albumins musste eine Eichgerade erstellt werden. Hierzu wurden 100 µl Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung (1 mg/ml), mit 100 ml Puffer A verdünnt. Daraus wurden folgende Standardkonzentrationen jeweils in mg/l angesetzt: 0,00; 0,03; 0,05; 0,07; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; und 1 mg/l. Lagen die Extinktionen der Proben nicht mittig der Kalibriergeraden, musste eine entsprechend andere Verdünnung gewählt werden (s.o.).

Die Erstellung der Eichgeraden, das Ablesen der Extinktion und der Ausdruck der Endwerte in mg/l erfolgten mit Hilfe des Computers. Zum Schluss wurde aus den Werten in g/l durch Beziehung der Urinproben auf die Verdünnung und auf das tägliche Urinvolumen die Albuminausscheidung in mg pro 24 Stunden berechnet.

2.6.2 Protein- und Kreatininbestimmung

Es wurde im Labor der Klinischen Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, aus dem 24-Stunden-Urin das Gesamtprotein nach der Bradford-Methode¹⁷ bestimmt.

Sowohl im 24-Stunden-Urin als auch in dem bei der Tötung entnommenen Serum wurden das Kreatinin gemessen und später die Kreatinin-Clearance berechnet.

Diese Messungen erfolgten über Standardmethoden im Labor 28, Mecklenburgische Strasse 28, 14197 Berlin.

Die Berechnung der Kreatinin-Clearance erfolgte nach der Formel:

$$\text{Kreatinin-Clearance} = \frac{\text{Urinkonzentration von Kreatinin} \times \text{Harnvolumen}}{\text{Plasmakonzentration von Kreatinin} \times \text{Zeit}}$$

2.7 Tötung und Organentnahme

Am Ende der vierten postoperativen Woche wurden die Tiere aus dem FEM in die Räume der klinischen Pharmakologie gebracht. Sie wurden aus ihren Gemeinschaftskäfigen in Einzelkäfige umgesetzt, gewogen und der Allgemeinzustand des Tieres wurde eingeschätzt. Die Tiere wurden auf die gleiche Weise, wie zur Operation beschrieben, narkotisiert. Das weitere Vorgehen entsprach bis auf Desinfektion und Rasur ebenfalls dem in Absatz 2.3.1 beschriebenen.

Die Tötung erfolgte, nach einer für eine andere Studie verwendete Herzkatheteruntersuchung, durch Exsanguierung über eine im linken Ventrikel befindliche Braunüle. Ein bis drei Milliliter Blut wurden dabei in Eppendorf-Röhrchen aufgefangen um Serum zu gewinnen. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 8000 U/min und 4 °C (Eppendorf, Zentrifuge 5417 R) wurde das Serum von korpuskulären Bestandteilen getrennt, abpipettiert und in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen schockgefroren.

Sofort nach dem Ausbluten erfolgte die Sektion mit Organentnahme. Abdomen und Thorax wurden großflächig eröffnet. Herz, Lunge, Leber und Niere wurden makroskopisch begutachtet und bei den Tieren mit Nx wurde der Anteil des vorhandenen Nierengewebes beurteilt, um die Reduktion um 5/6 des Nierengewebes zu kontrollieren.

Den Tieren wurden die Nieren und Herzen entnommen:

1. Herz:

Nach Entfernung der großen Gefäße wurde das Herz gewogen. Der rechte Ventrikel wurde septumnah vom linken Ventrikel abgetrennt und in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Ventrikel mit Septum interventrikulare wurde erneut gewogen. Es wurde die Herzspitze abgetrennt, dann eine Scheibe aus der Herzmitte herausgetrennt und in Duboscq-Brasil-Lösung für eine eventuelle anschließende histologische

Beurteilung fixiert. Die Herzspitze und der Rest des Organs wurden ebenfalls schockgefroren.

3. Niere:

Die linke Niere wurde aus ihrer Kapsel gelöst. Gefäße und Ureter wurden aus dem Hilum entfernt. Das Ausmaß der Nekrose wurde bestimmt und notiert. Dabei gingen die Tiere nur in die Untersuchungen ein, wenn ca. 5/6 des Nierengewebes makroskopisch als nekrotisch erkennbar waren. Ein kleiner Teil des verbleibenden funktionstüchtigen Nierengewebes wurde abgetrennt und in Methacarn-Lösung fixiert, um später eine histologische Begutachtung durchführen zu können. Der Organrest wurde wiederum schockgefroren.

Die Lagerung der Organproben und des Serums erfolgte in 2 ml Eppendorf-Röhrchen bei -81 °C in den Räumen der klinischen Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin. Die Tierkadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung entsorgt.

2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „SPSS 11.0“ der Firma Statistical Product and Service Solution Inc. (SPSS) und „SigmaPlot 8.0“ von Systat Software Inc. Innerhalb der Werte einer Gruppe wurde der Mittelwert gebildet und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt, z.B. $159 \pm 5,1$.

Die statistische Analyse auf Signifikanz erfolgte mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test und Bonferoni-POST-HOC-Test. Zur Analyse von Korrelationen wurden die Koeffizienten nach Spearman bestimmt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $p < 0,05$ angenommen. Im Stammvergleich wurden die beiden Tierstämme MWF und Wistar mit Hilfe der Standardabweichung des Mittelwertes verglichen.

2.9 Materialien

2.9.1 Lösungen

Coating-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Fixierlösung für Nieren (Methacarn)	Methanol Chloroform Eisessig	60 ml 30 ml 10 ml
Fixierlösung für Herzen	Ethanol 80 % Pikrinsäure Formaldehyd 37 % Eisessig	150 ml 1 g 60 ml 5 ml
Rattenantikörper	mit Puffer A verdünnt 1:9000	
Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA -Dihydrat Tween 20 ad 800 ml Aqua bidest. 1 M Kaliumchlorid pH 7,4 ad 1 l Aqua bidest. Gelatine	20 mM 150 mM 0,1 mM, pH 8,0 0,1% , w/v 5 g
Rattenserum-Albumin- stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1,0 mg/ml 0,1 M
Substratlösung	3,3',5,5' TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µl
Schwefelsäure	2 M	

2.9.2 Chemikalien und Medikamente

ACE-Hemmer Ramipril	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Bad Soden
2-Propanol 70 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bepanthen Augensalbe	Roche, Grenzach-Wyhlen
Esketaminhydrochlorid 43mg/kg KG (Ketanest S 25 mg/ml)	Parke-Davis, nun Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Novaminsulfon	Ratiopharm GmbH, Ulm
Paracetamol-Saft	Ratiopharm GmbH, Ulm
Schwefelsäure 96 %, v/v	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20 BioRad,	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylazin Hydrochlorid 13 mg/kg KG Rompun 2 %	Bayer Vital GmbH Leverkusen

Rattenserum-Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin-Rat Polyclonal Antibody	ICN Pharmaceuticals Germany GmbH, Frankfurt
Gelatine (75 bloom)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Mallinckrodt Baker Chemikalen, Groß-Gerau
Formaldehyd 37 %, v/v	Mallinckrodt Baker Chemikalen, Groß-Gerau
Pikrinsäure Merck	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethylmalonsäure 98 %, w/w	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %, v/v	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Polividon-Iod (Braunol)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Mallinckrodt Baker Chemikalen, Groß-Gerau Baker,
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB) Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.9.3 Instrumente und Nahtmaterial

Anatomische Pinzette Standard BD 47/ BD 35	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Chirurgische Pinzette Standard BD 557	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Chirurgische Schere Standard-Modell BC 320	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Feine Präparierschere BC 2	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Sterican Kanülen Gr.1, Gr. 12, Gr. 26	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Micro-Pinzette Uhrmacher Modell BD 329	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Mikro-Nadelhalter Barraquer FD 230	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Nadelhalter Crile-Murray BM 219	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

Wundspreizer Mellinger OA 241	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Nahtmaterial Perma Handseide 0	Sutupak, Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial geflochten 3-0, Dexon II	B. Braun-Dexon GmbH, Tuttlingen
Nahtmaterial Monofilament 6-0, Biosyn	Tyco Healthcare, Basingstoke, UK
Sterile Einwegspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Einwegspritzen 1 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.9.4 Geräte

Analysewaage	Satorius AG, Göttingen
Blutdruckmessgerät	TSE, Bad Homburg
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex Technologies, Inc. Chantilly, USA
Haarschneider	Braun, Kronberg
Mikrotiterplattenschüttler	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Neigungswaage	Bizerba, Sauter KG. Ebingen
Präzisionswaage	Satorius AG, Göttingen
Zentrifuge, Tischzentrifuge 5415C, 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

2.9.5 Sonstige Materialien und Futtermittel

Glasgefäße mit Schraubverschluss, 20 ml Econo Glas	Packard BioScience, jetzt PerkinElmer, Wellesley, USA
Haltungsfutter für Ratten	Ebeco, Castrop-Rauxel
Kryobox	
Leukosilk 2,5 cm	Beiersdorf, Hamburg
Makrolonkäfige	Ebeco, Castrop-Rauxel
Messzylinder	Schott Duran GmbH & Co. KG, Mainz
Pipette Reference 10-100 µl, 100- 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Mullkompressen 5 x 5 mm	Lohmann Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf

Stoffwechselfkäfige für Ratten	Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten	ABgene Deutschland, Hamburg
Untersuchungshandschuhe, Safeskin	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Mainz
Wattestäbchen 15 cm	Lohmann Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf
Glasplatte, zugeschnitten, gerader Schliff	

2.9.6 Tiere

Wistar-Ratten	Charles River WIGA Deutschland GmbH, Sulzfeld
MWF/Ztm-Ratten	Milan-Wistar-Frömter Ratten, Inzucht aus dem FEM, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin