

2. Material und Methoden**2.1. Material****2.1.1. Verwendete Pufferlösungen und Substanzen**

Alle Pufferlösungen wurden, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben auf einen physiologischen pH-Wert von 7,40 eingestellt.

Tabelle 2: PSS (Tyrodelösung)

NaCl	118,00 mmol/l
NaHCO ₃	25,00 mmol/l
Glucose	5,50 mmol/l
KCl	4,70 mmol/l
CaCl ₂	1,80 mmol/l
Mg ₂ SO ₄	1,20 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	1,00 mmol/l
Na ₂ EDTA	0,03 mmol/l

Tabelle 3: HBSS (HEPES modifizierte Salzlösung)

NaCl	136,00 mmol/l
HEPES	10,00 mmol/l
D-Glucose	5,60 mmol/l
KCl	5,40 mmol/l
CaCl ₂	1,00 mmol/l
K ₂ HPO ₄	0,44 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	0,34 mmol/l

2.1.2. Substanzen

- Acetylcholin	Fa.: Merck
- Angiotensin II	Fa: Sigma
- Apocynin	Fa.: Calbiochem
- Bidestilliertes Wasser	Fa.: Fluka
- Dinatriummethyldiaminetetraessigsäure	Fa.: Merck
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fa.: Merck
- Diphenylene iodonium	Fa.: Calbiochem
- Essigsäure	Fa.: Merck
- Ethanol	Fa.: Merck
- Glukose	Fa.: Merck
- Kaliumacetat	Fa.: Merck
- Kaliumchlorid	Fa.: Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat	Fa.: Sigma
- Kalziumchlorid	Fa.: Sigma
- L-NAME	Fa.: Sigma
- Magnesiumsulfat	Fa.: Sigma
- Natriumdihydrogenphosphat	Fa.: Merck
- Natriumhydrogencarbonat	Fa.: Merck
- Natriumhydroxid	Fa.: Merck
- Natriumnitroprussid	Fa.: Sigma
- Norepinephrin	Fa.: Sigma
- Phenylephrin	Fa.: Sigma
- Phosphorsäure	Fa.: Sigma
- Stickstoff	Fa.: Linde
- Sylgaard	Fa.: Merck
- Tiron	Fa.: Merck
- Urethan	Fa.: Sigma
- Yohimbin	Fa.: Sigma

Die Substanzen, die für die Herstellung der Pufferlösungen verwendet wurden, stammen ausschließlich von der Firma Sigma pro analysis.

2.1.3. Tiere zur Explantation

In den Versuchen wurden die thorakalen Aorten von männlichen Wistar – Kyoto – Ratten (WKY) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland), männlichen C57BL/6 Mäusen der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA), eNOS defizienten Mäusen (eNOS -/-) der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA), sowie S1P₃ Rezeptor defizienter männliche Mäuse (freundlich Überlassen von Prof. Dr. Bodo Levkau, Universität Essen) verwendet. Die WKY Ratten haben ein Durchschnittsalter von 125 Tagen (105 – 134 Tage) und ein durchschnittliches Gewicht von 257 g (247 – 284 g). Die C57BL/6-Mäuse haben ein Durchschnittsalter von 54 Tagen (48 – 65 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 27 g (23 – 34 g). Die eNOS defizienten Mäuse haben ein Durchschnittsalter von 58 Tagen (51 – 64 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 27 g (24-36 g). Die S1P₃ Rezeptor defizienten Mäuse haben ein Durchschnittsalter von 57 Tagen (49 – 62 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 25g (22 – 33g). Die Tiere werden, bei Raumtemperatur von 19° bis 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% bis 70%, in Kolonien gehalten. Die Einstreu der Käfige wird von der Firma Altromin bezogen, es handelt sich dabei um entstaubte und entkeimte Weichholzfäsern. Den Tieren steht Trinkwasser und Trockenfutter ständig zur Verfügung. Diese Grundnahrung wird dreimal wöchentlich durch Getreidekörner und Obst ergänzt. Da der Tierstall ohne Fenster ist, wird mit Dauerbeleuchtung ein Tagesrhythmus von 12 Stunden geschaffen. Die Tiere bleiben mindestens 5 Tage nach Anlieferung im Tierstall, frühestens am sechsten Tag werden sie für Tierversuche genutzt.

2.2. Verwendete technische Materialien**2.2.1. Geräte und Hilfsmittel**

- Analysewaage	Fa.: Sartorius
- Computer	Fa.: Fujitsu Siemens
- Gefrierschränke - 80 °C	Fa.: Heraeus, Forma
- Gefrierschränke - 20 °C	Fa.: Liebherr, Bosch
- Glasbehälter (Kolben etc.)	Fa.: Brand
- Kleingefäß-Myograph Modell 410A	Fa.: DMT
- Kühlschränke	Fa.: Bosch, Liebherr

- Magnetrührer	Fa.: IKA-Werk
- Mikroskope	Fa.: Ca Zeiss, Nikon
- Monitor	Fa.: LG
- pH-Messgeräte	Fa.: Beckman
- pH-Messelektrode MI-410	Fa.: Microelectrodes
- Pipetten	Fa.: Eppendorf
- Rotator	Fa.: Rettenberg
- Schüttler	Fa.: New Brunswick
- Vortex	Fa.: Roth
- Wasserbäder	Fa.: Haake, Julabo
- Vakuumpumpe Laboport	Fa.: KNF
- Zentrifugen	Fa.: Heraeus Sorvall

2.2.2. Verbrauchsmaterial

- Einwegskalpelle	Fa.: Rüttgers
- Fadenmaterial	Fa.: Firma Johnson
- Pipettenspitzen	Fa.: Süd Laborbedarf
- Präparationsbesteck	Fa.: FST
- Reaktionsgefäße 0.5 ml	Fa.: Sarstedt
- Reaktionsgefäße 1.5 ml, 2.0 ml	Fa.: Eppendorf
- Reaktionsgefäße 15 ml, 20 ml	Fa.: Falcon, Greiner
- Schläuche	Fa.: VWR
- Spritzen und Kanülen (Sterican)	Fa.: Braun

2.2.3. Software

- Adobe Photoshop 7.0	Fa.: Adobe Systems
- MS Office 2003 Professional	Fa.: Microsoft Corp.
- MS Explorer 6.0	Fa.: Microsoft Corp.
- Myodaq 2.2	Fa.: DMT
- Myodata 2.2	Fa.: DMT
- Prism 4.0	Fa.: Graph Pad Soft

2.2.4. Firmenverzeichnis

Firma Adobe Systems Inc.:	San Jose/ USA
Firma Altromin:	Soest/ D
Firma Beckman:	Palo Alto/ USA
Firma Bosch:	Stuttgart/ D
Firma Brand:	Wertheim/ D
Firma Braun:	Melsungen/ D
Firma Calbiochem:	Frankfurt a.M./ D
Firma Carl Zeiss:	Jena/ D
Firma Charles River:	Herndon/ USA
Firma Compaq/HP:	Berlin/ D
Firma DMT Danish Myo Technology (früher: JP Trading):	Aarhus/ DK
Firma Eppendorf:	Hamburg/ D
Firma Falcon:	Oxnard/ USA
Firma Fluka:	Buchs/ CH
Firma Forma Scientific:	Marietta/ USA
Firma FST:	Foster City/ USA
Firma Fujitsu Siemens:	Sunnyvale/ USA
Firma Graph Pad Software:	San Diego/ USA
Firma Greiner:	Nürtingen/ D
Firma Haake:	Karlsruhe/ D
Firma Heraeus:	Osterode/ D
Firma Hugo Sachs:	March-Hugstetten/ D
Firma Hund:	Wetzlar/ D
Firma IKA-Werk:	Staufen Breisgau/D
Firma Jackson Laboratory	Bar Harbor, USA
Firma Johnson & Johnson:	Norderstedt/D
Firma Julabo:	Seelbach/ D
Firma KNF:	Freiburg/D
Firma LG:	Seoul/Ko
Firma Liebherr:	Biberach/ D
Firma Linde:	Wiesbaden/ D
Firma Microelectrodes:	Bedford/ USA

Firma Microsoft Corp.:	Redmond/USA
Firma Merck:	Darmstadt/ D
Firma NeoLab:	Heidelberg/ D
Firma New Brunswick Scientific	New Jersey/ USA
Firma Nikon:	Tokio/ J
Firma Rettenberg:	Göttingen/ D
Firma Roth:	Karlsruhe/ D
Firma Rüttgers:	Solingen/ D
Firma Sakura Finetek Europe:	Zoeterwonde/ NL
Firma Sarstedt:	Nürmbrecht/ D
Firma Sartorius:	Göttingen/ D
Firma Sigma:	St. Louis/ USA
Firma Sorvall:	Newtown/ USA
Firma Süd Laborbedarf:	Gauting/ D
Firma VWR:	Darmstadt/D

2.3. Der Kleingefäß-Myograph:

2.3.1. Allgemeine Arbeitsweise des Myographen:

Der Kleingefäß-Myograph wurde im Jahre 1976 von Mulvany und Halpern (Mulvany and Halpern 1976) in die wissenschaftliche Untersuchungstechnik eingeführt. Mit dem Myographen ist es möglich geworden, Messdaten über die Eigenschaften von kleinen Gefäßen zu gewinnen, dabei stehen besonders pharmakologische Eigenschaften, aber auch mechanische und morphologische Eigenschaften im Vordergrund. Mit dieser Methode ist es möglich Gefäßsegmente, die man aus der Aorta oder anderen Widerstandsgefäßen gewonnen hat, in Form von Ringpräparaten in den Myographen einzuspannen. Dabei können die Gefäßlumina bis zu 100 µm klein sein. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in der nahezu atraumatischen Präparation und der anschließenden Messung der Gefäßeigenschaften im Myographen. Diese Messungen können unter genau festgesetzten isometrischen Bedingungen durchgeführt werden. Damit ist es möglich eine genaue pharmakologische Charakterisierung eines einzelnen Widerstandsgefäßes vorzunehmen.

2.3.2. Die allgemeinen physiologischen Gegebenheiten:

Durch die Gefäßinnendruckmessung an verschiedenen Gefäßbettsystemen wurde ermittelt, dass in einer Reihe von Gefäßregionen der präkapilläre Druckverlust zu mehr als 50 % in Gefäßen auftritt, deren Innenlumendurchmesser größer als 100 µm ist. Diese Gefäßabschnitte dienen dem Aufbau und der Erhaltung des peripheren Widerstands. Sie scheinen den Blutfluss durch die einzelnen Organe auf den benötigten Bedarf zu regulieren, sie werden als proximale Widerstandsgefäße bezeichnet. Die distal liegenden Gefäßabschnitte reagieren auf die Stoffwechsellage und steuern den Blutzuffluss zu den einzelnen Zellen eines Organs.

Der hier beschriebene Kleingefäß-Myograph lässt Aussagen zu proximalen Widerstandsgefäßen zu mit einem Innendurchmesser von 100 µm – 2 mm. Die distalen Widerstandsgefäße können mit dieser Methode nicht erfasst werden. Die Gefäße unterschiedlicher Gefäßgebiete unterscheiden sich, ebenso Gefäße unterschiedlicher Tierarten. Es wurde erkannt, dass die proximalen renalen, mesenterialen und femoralen Widerstandsgefäße der Ratte auf Norepinephrin mit einer Kontraktion reagieren, während die zerebralen und koronaren Widerstandsgefäße mit einer Relaxation auf Norepinephrin antworteten (Nyborg, Byg-Hansen et al. 1985). Der Kleingefäßmyograph lässt nur Aussagen über die jeweils untersuchten Gefäße zu. Nur mit Vorsicht und nach weiteren physiologischen Untersuchungen sind die so gewonnenen Aussagen auf Gefäße anderer Regionen oder auf andere Spezies übertragbar.

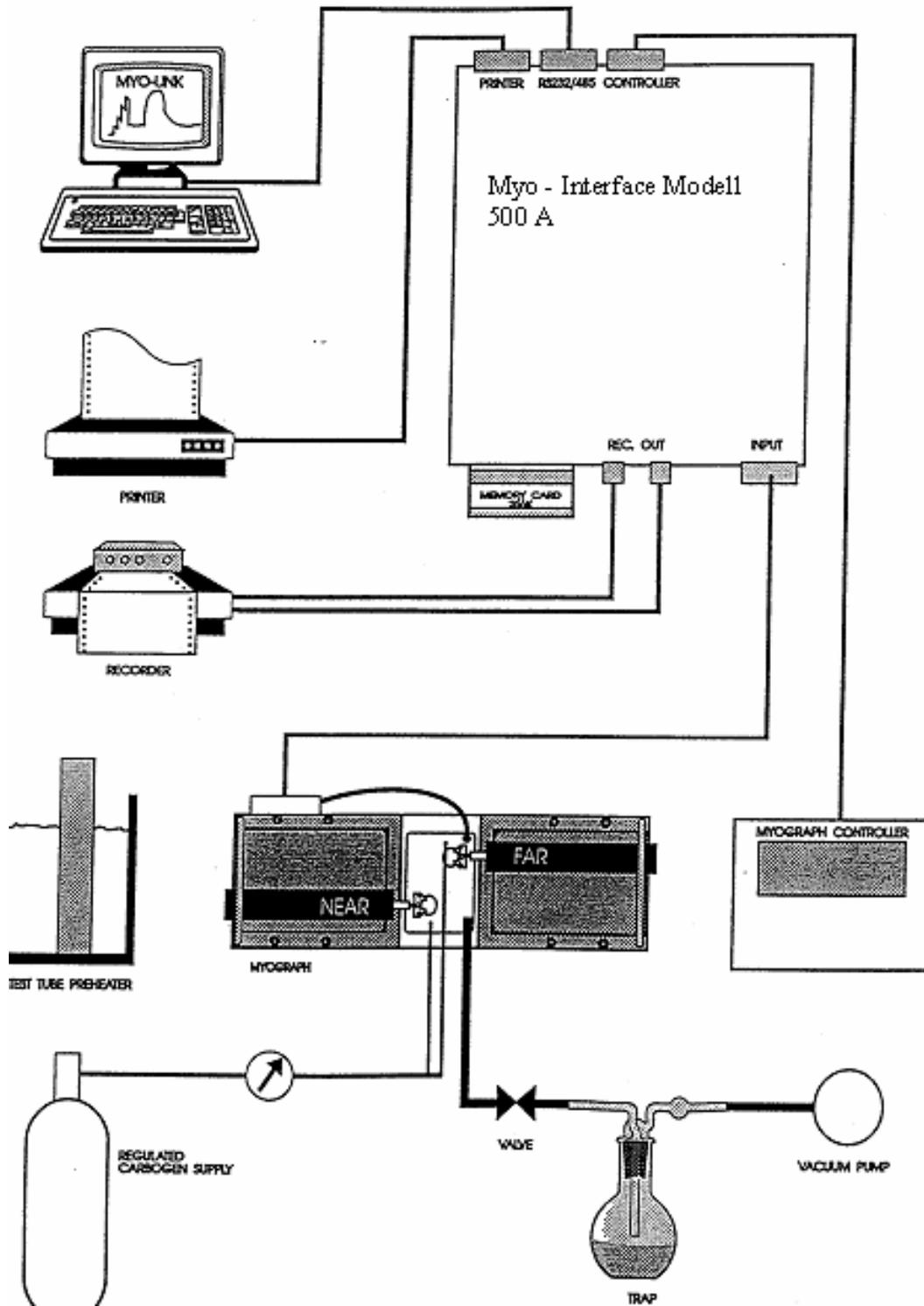


Abbildung 1: Geräteanordnung des Kleingefäß-Myographen (aus „Procedure for investigation of small vessel using small vessel myograph“, Mulvany M.J., 1996)

2.3.3. Aufbau des Kleingefäß-Myographen:

Der Kleingefäß-Myograph Modell 410A der Firma JP Trading erlaubt es simultan zwei Gefäßpräparate zu messen. Er besteht aus einem Gehäuse mit einer eingebautem rostfreien Edelstahlkammer, deren Volumen beträgt ca. 15 ml. Ferner enthält das Gehäuse eine Heizung und Kraftmesser. Die Kammer enthält zwei Trägerbacken, zwischen die die Gefäßpräparate eingespannt werden. An den Myographen ist das Computersystem, Myo-Interphase, außerdem eine Vakuumpumpe und ein Begasungssystem angeschlossen. Die Edelstahlkammer wird mit einer Abdeckung verschlossen, die Abdeckung besitzt Öffnungen über die Substanzen in die Kammer verbracht werden können, aber natürlich ist auch das Entfernen von Substanzen möglich, außerdem dient eine der Öffnungen der kontinuierlichen Begasung der Kammer. Die Abdeckung dient dazu die Evaporation des Kammerinhalts zu vermindern, außerdem kann so der Sauerstoffpartialdruck konstant gehalten werden. Die Testsubstanzen und Verwendeten Lösungen werden der Kammer über einen speziellen Zugang innerhalb der Abdeckung zugeführt. Als Begasungsmittel wird Carbogen (95 % Sauerstoff und 5 % CO₂) verwendet, dadurch herrscht in der Kammer während des gesamten Ablaufs ein konstanter pH-Wert von 7,40. Der pH-Wert wird während des Versuchs mehrfach überprüft. Die Testsubstanzen werden mit dem Vakuumsystem entfernt. Dieses System besteht aus der Vakuumpumpe, die über ein Vakuumventil mit einem Auffanggefäß verbunden ist. Die kontinuierliche Temperaturmessung erfolgt über einen eigenen Zugang mit einem Temperaturfühler, dieser misst mit einem Auflösungsvermögen von 0,1°C die Temperatur innerhalb der Kammer. Die Heizung des Myographen ermöglicht Temperaturen zwischen 0°C und 50°C. In den Versuchen wurde eine Temperatur von 37°C verwendet, diese Temperatur wird während des gesamten Versuchs beibehalten. Die in die Kammer eingebrachten Flüssigkeiten werden in einem externen Wasserbad auf 37°C erwärmt, damit unterbleiben relevante Temperaturschwankungen beim Wechsel des Kammerinhalts. Dies ist wichtig, um thermische Veränderungen des Kraftmessers zu verhindern. Die beiden Trägerbacken sind mit Strukturen des Gehäuses verbunden. Ein Träger ist mit dem Kraftmesser verbunden, der andere Träger ist mit einer Mikrometerschraube verbunden. Diese Mikrometerschraube ermöglicht die Annäherung/Entfernung beider Trägerbacken in µm Schritten. Der Kraftmesser besteht aus einem Piezo gesteuerten Widerstandssensor, der mit dem extern gelegenen Myo-Interface über ein Kabel verbunden ist. Der Kraftmesser besitzt ein Messbereich von 250 mNewton, das Auflösungsvermögen liegt bei 0,01 mNewton, damit können kleinste Kraftänderungen, die durch Kontraktion oder Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäßmedia entstehen, erfasst werden. Das Myo-Interface ist ein Computer gestütztes Datensystem, die Messergebnisse werden digital gespeichert und

ausgewertet. Die Datengewinnung erfolgt mit dem Programm Myodaq 2.2 von JP Trading. Alle Daten werden parallel übertragen und in Abhängigkeit von der Messzeit gespeichert. Die in Myodaq gespeicherten Daten werden mit dem Analyseprogramm Myodata 2.2 von JP Trading ausgewertet.

2.3.4. Der Versuchsablauf:

Für die einzelnen Versuche wurden thorakale Aorten verwendet. Diese Aorten wurden aus den oben angegebenen Tieren explantiert. Die Anästhesie der Tiere erfolgte mit Urethan (Ethylcarbamate) in der Dosierung 1,4 g pro kg Körpergewicht, das Anästhetikum wurde intraperitoneal appliziert. Nach erfolgter Anästhesie wurde durch mediane Laparatomie die thorakale Aorta freigelegt und unter Zuhilfenahme einer Mikroschere mobilisiert. Dabei war besonders darauf zu achten, dass die Aorta weder in longitudinaler noch transversaler Ebene gedehnt wurde, um strukturelle Schäden zu vermeiden. Nach erfolgter Mobilisation wurde die Aorta am abdominothorakalen Übergang auf Zwerchfellhöhe durchtrennt und vorsichtig gelöst. Die Aorta wurde im Anschluss an die Präparation in ein Becherglas mit physiologischer Kochsalzlösung (Tyrodelösung) überführt. Die Tyrodelösung wurde im Kühlschrank auf 4°C gekühlt und vor der Nutzung 10 Minuten lang mit Carbogen begast. Um die Aorta weiter zu präparieren, erfolgte die Umlagerung in eine mit Tyrodelösung gefüllte Petrischale. Mit Hilfe des binokularen Mikroskops und 10facher Vergrößerung erfolgt nun die Freilegung der Aorta, dazu befindet sich auf dem Boden der Petrischale eine ca. 5 mm dicke Schicht eines Polymers (Sylgaard). Dieses Polymer ermöglicht eine schonende Fixation der Aorta, ohne weitere Hilfsmittel, und dient damit der Feinpräparation ohne die Gefahr einer Strukturschädigung durch Überdehnung. Nachdem das periadventielle Bindegewebe entfernt wurde, können 2 mm lange Stücke von der Aorta abgetrennt werden. Durch dieses 2 mm lange Stück werden zwei 40 µm durchmessende Drähte geführt. Das Präparat und die Drähte werden nun in die mit Tyrode gefüllte Kammer überführt und zwischen den Trägerbacken fixiert. Dabei ist besonders jede Einklemmung zu vermeiden, außerdem muss das Gefäßstück frei beweglich sein. Die Drähte werden an den Schrauben fixiert, durch Drehung an den Mikrometerschrauben werden die Träger solange auseinander geschoben bis die Gefäße spannungsfrei auf den Drähten liegen und keine Berührung der Träger besteht. Diese Trägerstellung wird als Ausgangstellung definiert, die Kraftanzeige am Myo-Interface wird auf Null eingestellt.

2.3.5. Eichung des Kraftmessers:

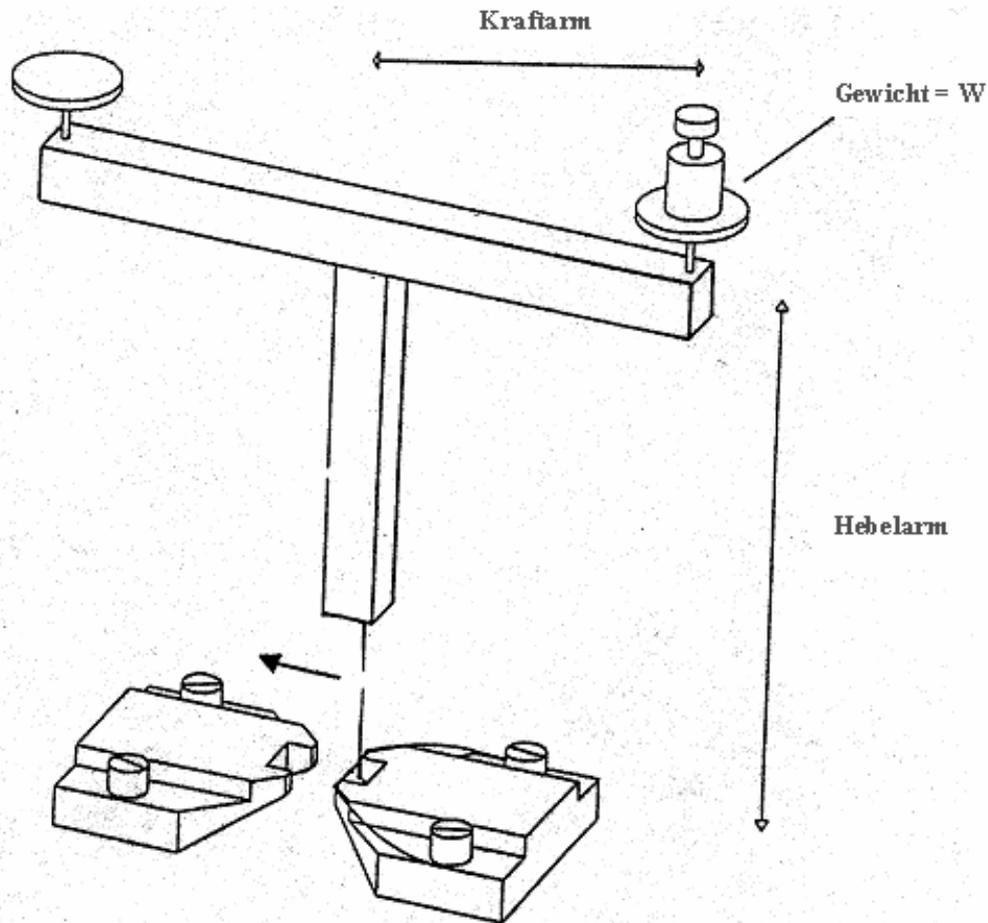


Abbildung 2: Darstellung der Kalibrierungswaage bei Eichung des Kraftmessers.

Die Eichung erfolgt in regelmäßigen Abständen, dabei wird ein Draht an dem Träger am Kraftmesser befestigt. Mit Hilfe einer speziellen Kalibrierungswaage wird die Kraftanzeige auf 9,81 mNewton/g geeicht. Der Hebelarm der Kalibrierungswaage wird dazu so positioniert, dass er genau in dem Raum zwischen Trägerbacke und eingespannten Draht liegt, ohne den Träger zu berühren und ohne einen Ausschlag des Kraftmessers zu verursachen. Danach wird der Kraftarm der Kalibrierungswaage mit einem Gewicht von 2 g belastet. Das Verhältnis zwischen Kraftarm und Hebelarm der Waage beträgt 2 cm zu 4 cm, damit wirkt nun die Gleichung: $F_{\text{Kraftmesser}} = W \cdot g \cdot (\text{Kraftarmlänge}/\text{Hebelarmlänge})$

Dabei entspricht g der Gravitationskonstanten ($g = 9,81 \text{ mNewton/g}$) einer Kraft von $9,81 \text{ mNewton}$ auf dem Kraftmesser.

2.3.6. Die Standardisierung des normalisierten Lumendurchmesser:

Um vergleichende Messungen verschiedener Gefäße durchführen zu können, ist es notwendig einen definierten Lumendurchmesser für das Gefäß festzulegen. Die Sensitivität der präparierten Gefäße auf ihre Reaktivität gegenüber Agonisten ist vom Ausmaß der Vorspannung des Gefäßes abhängig. Um pharmakologische Versuche durchzuführen ist es notwendig definierte Gegebenheiten zu schaffen. Die kontraktile Elemente der glatten Muskulatur, Myosin und Aktin, arbeiten nur bei einer exakten Ausrichtung durch Vorspannung optimal zusammen. Nur so kann die Relation aus aktiver Wandspannung und innerem Lumendurchmesser ihr Optimum erreichen. Als optimaler innerer Lumendurchmesser wird der Durchmesser angesehen der bei vollständig relaxiertem Gefäß und einem transmuralen Druck von 100 mm Hg vorliegt, dieser Durchmesser wird als IC100 bezeichnet (Mulvany und Halpern et al. 1976). Die Standardisierung strebt diesen Zustand an. Bei der Normalisierung werden die beiden Träger zwischen die das Gefäß eingespannt ist, in μm Schritten voneinander entfernt, damit kommt es zu einer schrittweisen Erhöhung der Wandspannung. Der Myograph ermittelt sowohl die Mikrometerveränderungen, als auch die bei den einzelnen Entfernungsschritten entstehende Kraft. Es ist möglich den internen Umfang des Gefäßes zu ermitteln, dazu benötigt man den Abstand der beiden Träger zueinander und die Dicke der verwendeten Drähte. Die Länge des Gefäßpräparates wird mit einem kalibrierten Objektiv bestimmt, das auf das binokulare Mikroskop aufgesetzt wird. Die Gefäßlänge wird durch die doppelte Länge des unter dem Mikroskop gemessenen Gefäßsegments bestimmt, da die Gefäßlänge dieses Segments durch die obere und untere Gefäßwand bestimmt wird. Um die Wandspannung zu bestimmen, wird der Quotient aus gemessener Kraft und Gefäßlänge berechnet. Um den effektiv wirkenden Druck P_1 zu berechnen, wird die Gleichung nach Laplace verwendet (Mulvany und Halpern et al. 1976).

Es gilt:

$$P_1 = \text{Wandspannung} / (\text{Inneren Gefäßumfang} / (2 \cdot \pi))$$

Als effektiver Druck wird der Druck bezeichnet der notwendig wäre, um das Gefäß auf den gemessenen inneren Umfang zu erweitern. Es wird jedes Datenpaar aus Wandspannung und innerem Gefäßumfang erfasst und mit Hilfe des Normalisierungsprogrammes von Myodaq wird der sich daraus ergebende effektive Gefäßinnendruck errechnet. Sobald der effektive Druck 100

mmHg überschreitet wird die Gefäßextension abgeschlossen. Mit den so ermittelten Daten kann eine exponentielle Kurve errechnet werden, dabei wird der Gefäßinnendurchmesser gegen die dabei entstehende Wandspannung aufgetragen. Die Laplace'sche Beziehung ermöglicht es, den Gefäßinnendurchmesser innerhalb der entsprechenden Kurve zu bestimmen, bei dem eine Wandspannung von 100 mm Hg vorliegt (IC100). Experimente haben ergeben, dass bei einem Gefäßinnendurchmesser, der 90 % des IC100 beträgt, die aktive Kraftproduktion des Gefäßes am größten ist. Dieser Wert wird als IC1 bezeichnet (Mulvany und Halpern et al. 1976). Die Experimente am Kleingefäß-Myographen wurden mit Gefäßen durchgeführt, deren Gefäßinnendurchmesser $IC1 = 0,9 \cdot IC100$ aufweist. Dadurch ist es möglich, die einzelnen Gefäße zu vergleichen.

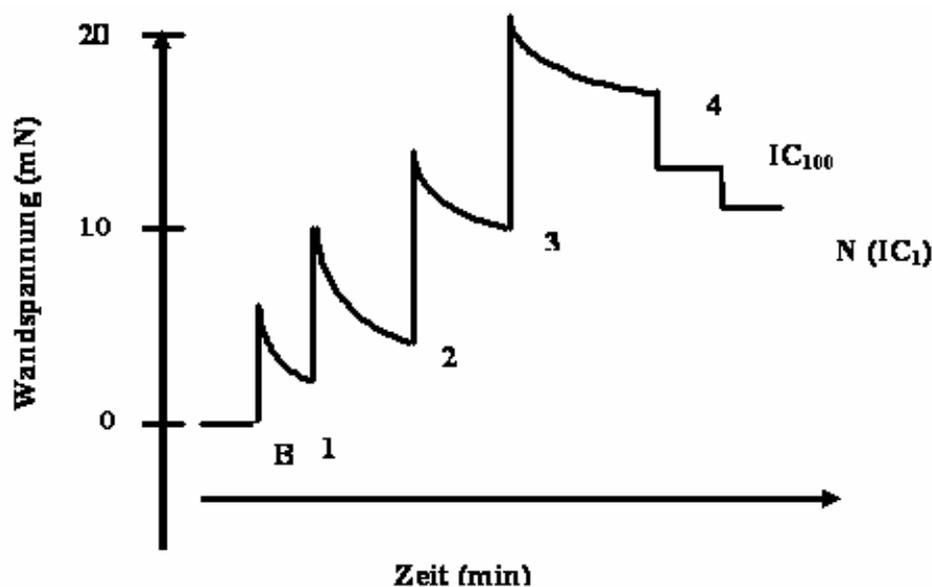


Abbildung 3: Darstellung eines Normalisationsvorganges.

Dargestellt ist ein Normalisationsvorgang. Der Messpunkt B gibt die tarierte Nullwandspannung wieder. Die Messpunkte 1, 2, 3 und 4 stellen die Wandspannung eine Minute nach manueller Dehnung um einige Mikrometer dar. Am Messpunkt 4 liegt ein transmuraler Druck über 100 mmHg vor, weshalb an diesem Punkt die Ruhespannung um einen definierten Betrag reduziert wird bis die Gefäße die IC100 besitzen. Messpunkt N zeigt die endgültige Einstellung auf den Innendurchmesser IC1.

2.3.7. Beweise für die Vitalität der Gefäße:

Jeder Versuchsablauf erfordert den Beweis für die Vitalität des jeweiligen Gefäßes. Dies dient dem Ausschluss beschädigter nicht mehr vitaler Gefäße. Für die Vitalitätsprüfung verwendet man Rezeptor-unabhängige kontraktile Stimulatoren, und Agonisten, die die Rezeptor-abhängige

Kontraktion und Dilatation testen. Als Rezeptor-unabhängige kontraktile Substanz wird Kaliumchlorid in einer Konzentration von 130 mM verwendet, dies führt zu einer Depolarisation der glatten Muskelzellen. Die Rezeptor-abhängige Kontraktion wird durch Norepinephrin, Phenylephrin und Angiotensin II, die als Agonisten zu einer Kontraktion führen. Die Rezeptor-abhängige Dilatation der Gefäße wird mit Acetylcholin überprüft, dies gibt genaue Hinweise auf den Funktionszustand des Endothels. Zur endothelunabhängigen Vasodilatation wird SNP (Natrium Nitroprussid) verwendet.

Nachdem die Gefäße auf den optimalen Innendurchmesser eingestellt sind, werden die Eigenschaften der Gefäße mittels folgender Vorkaskade getestet.

01. Kaliumchlorid (130 mM) bis zwei vergleichbare Kontraktionen registriert werden konnten.
02. Norepinephrin (10 μ m) bis ebenfalls zwei vergleichbare Kontraktion registriert werden
03. Nach der Norepinephrin induzierten Kontraktion werden die Gefäße mit Acetylcholin (10 μ m) dilatiert
04. Danach werden die Gefäße erneut mit Norepinephrin kontrahiert, es folgt nun die Dilatation mit SNP (10 μ m)
05. Zum Abschluss der Vorkaskade wird Phenylephrin (10 μ m) auf die Gefäße aufgebracht bis zwei vergleichbare Kontraktionen registriert werden konnten.

Falls es zu keinen Kontraktionen unter Norepinephrin oder Phenylephrin kommt oder nur sehr schwache Kontraktionen (< 5 mNewton unter Norepinephrin 10 μ m) erfolgen, werden die entsprechenden Gefäßabschnitte ausgespannt und durch neues Material ersetzt. Es werden nur Gefäße verwandt, die die Vorbedingungen erfüllt haben, diese werden in den Versuchen verwandt. Bei den Versuchen zeigen etwa 70 % der Gefäßpräparate reproduzierbare kontraktile Antworten auf die jeweiligen Agonisten, ca. 30 % müssen verworfen werden. Jeder Versuch wird an mindestens 6 unterschiedlichen Gefäßpräparaten durchgeführt.

2.3.8. Dosiswirkungskurven verschiedener Agonisten:

Am Anfang jeder Versuchsreihe wurden Dosiswirkungskurven von Norepinephrin, Phenylephrin und Angiotensin II durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen der Agonisten, von 1nM bei Angiotensin, 10 nM bei Norepinephrin und Phenylephrin bis auf 10 μ m gesteigert, diese halblogarithmischen Stufen dienten der Ermittlung der maximalen Kontraktionsantwort. Die Durchführung der Versuche erfolgte kumulativ und nicht kumulativ. Dabei musste man bei

Angiotensin II Wartezeiten von 120 Minuten einlegen, da für Angiotensin II eine Tachyphylaxie bekannt ist, die die Messwerte verfälschen kann (Scotland R et al. 1999). Als angemessene Latenzzeit zwischen den einzelnen Angiotensin II Applikationen wurde die Zeit ermittelt bei der man Angiotensin II induzierte Maximalkontraktionen auslöste, dabei löste man eine zunehmend längere Wartezeit zwischen 10 und 150 Minuten aus.

2.3.9. Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse:

Dadurch, dass einzelne Versuche eine Dauer von bis zu 8 Stunden aufweisen, musste die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für Maximalkontraktionen und Dosis-Wirkungskurven der einzelnen kontraktil wirkenden Substanzen über diesen Zeitraum untersucht werden. Die Überprüfung erfolgte durch repetitive Applikation der Maximalkontraktion oder durch repetitive Anfertigung von Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen Agonisten. Über 8 Stunden wurden die kontraktilen Eigenschaften der Gefäße und die Antwort der Kontraktilität untersucht. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Gefäßkontraktion gefunden.

2.3.10. Deendothelialisierung der Gefäße:

Zur Durchführung der Deendothelialisierung wurde eine 45 % (w/v) Saponinlösung mittels eines Katheters durch das Lumen des Gefäßes gespült. Die benötigte Perfusionszeit, die man benötigt um eine isolierte Elimination der Endothelschicht zu erreichen, ohne Myozyten zu beeinflussen, wurde in Vorversuchen ermittelt. Diese Zeit beträgt 30 Sekunden. Jeder Versuch an deendothelialisierten Gefäßen wurde mit der Überprüfung des Funktionsverlustes der Endothelzellen durchgeführt. Wenn unter Zusetzung von 10 μ m Acetylcholin keine Dilatation an durch Norepinephrin vorkontraktierten Gefäßen erreicht werden konnte, oder es gar zu einer Kontraktion kam, konnte von einer Deendothelialisierung ausgehen. Die endothelunabhängige Vasodilatation des Gefäßes wurde mit SNP überprüft. Für Versuche an deendothelialisierten Aorten fanden nur Gefäße Anwendung, die keine endothelabhängige Dilatation, bei erhaltener endothelunabhängiger Dilatation, zeigten.

2.3.11. Statistik:

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Effekte wurden als Kraftänderungen in mN registriert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Analyseprogrammes Myodata 2.2 von DMT (früher: JP Trading), das die zuvor über Myodaq gespeicherten Daten auswertet. Ein Wert von $P < 0.05$ wird als statistisch signifikant betrachtet.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen Gruppen von unverbundenen Stichproben mit potenziell unterschiedlicher Standardabweichung dar. Daher wurde für die statistische Signifikanztestung der verteilungsunabhängige U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet. Als Nullhypothese H_0 wurde angenommen, dass die Mittelwerte aus den Kraftänderungen unter SPC, ACh, SNP und PE bei Zugabe von L-NAME, Indometacin denen bei Zugabe von Tyrode entsprechen. Als Alternativhypothese H_1 wurde angenommen, dass unter der Zugabe der genannten Substanzen die entsprechenden Mittelwerte größer oder kleiner als unter Tyrode wären.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 > \mu_2 \text{ oder } \mu_1 < \mu_2$$

$\mu_1 =$ Mittelwert der Kraftänderung nach Applikation einer Testsubstanz unter Tyrode

$\mu_2 =$ Mittelwert der Kraftänderung nach Applikation von Indometacin und L-NAME

Der Stichprobenumfang über Tyrode betrug n_1 und über der jeweiligen Substanz n_2 . Für die gemessenen Werte wurde eine Rangordnung erstellt und jeder Messwert bekam eine Rangzahl zugeordnet. Die Summe der Rangzahlen der Messwerte über Tyrode war R_1 und die Summe der Rangzahlen über der jeweiligen Antagonisierung war R_2 . Die in diesem Test verwendeten Prüfgrößen U_1 und U_2 werden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$U_1 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_1 \times (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_2 \times (n_2 + 1) - R_2$$

Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn U als der kleinere Wert von U_1 und U_2 kleiner als der tabellierte kritische Wert $U(n_1, n_2)$ war. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ wurde im verwendeten Test als signifikant erachtet.