

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Messplatz

- Kraftaufnehmer: F30 HSE Transducer, Hugo Sachs Elektronik
- Feintrieb: Typ 850 N HSE, Hugo Sachs Elektronik
- Verstärker: Bridge Amplifier Type 660
- Schreiber: Multipen Recorder R50
- Organbad: Eigenbau Fa. Schering, Berlin

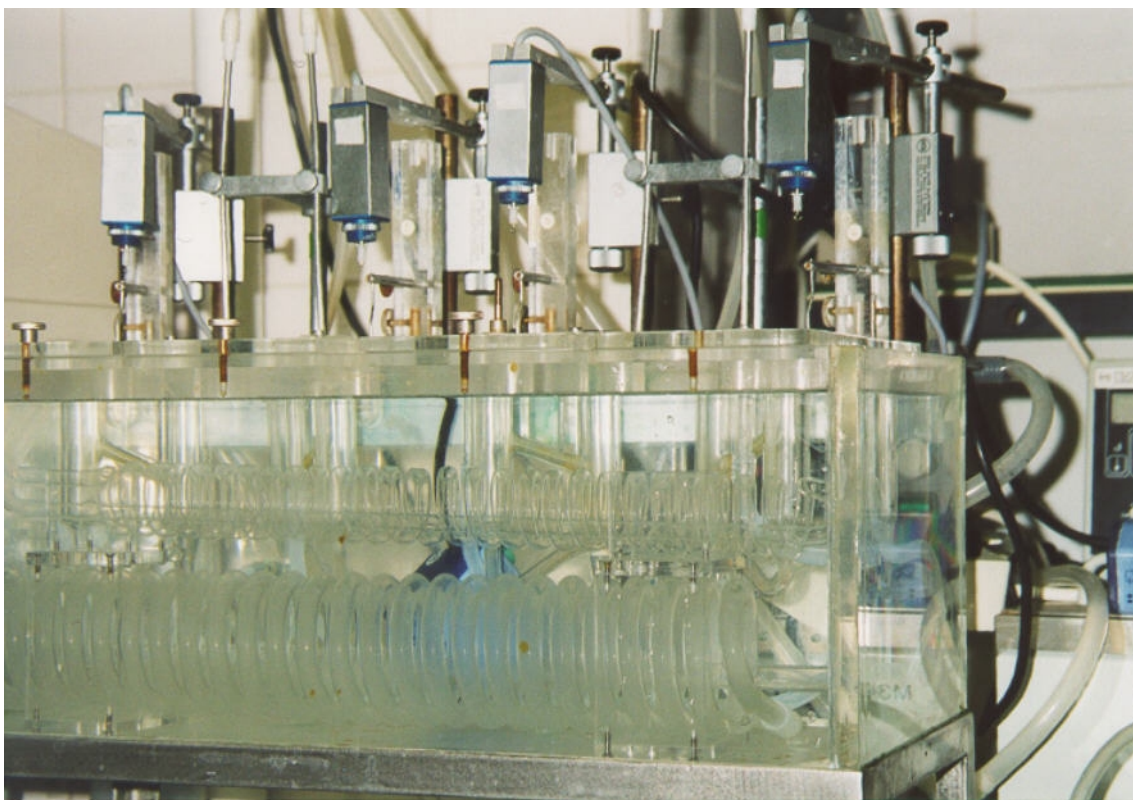
#### 2.1.2 Verwendete Pharmaka

- Aether zur Narkose ASID, ASID BONZ GmbH Böblingen, Deutschland
- Rompun 2%, Xylazin, Bayer AG, Leverkusen
- Ketanest 50, Ketaminhydrochlorid, Parke-Davis GmbH Berlin, 79090 Freiburg, Deutschland
- GDOC, Glucodeoxycholinacid, Sigma Aldrich Chemie GmbH
- Takus 40 $\mu$ g, Ceruletid-Tris-(diethylamin)-Salz, Phamacia & Upjohn GmbH, 91051 Erlangen, Deutschland
- T 61, Embutramid, Mebezoniumiodid, Tetracainhydrochlorid, Hoechst Veterinär GmbH, 85716 Unterschleißheim b. München, Deutschland
- Carbachol, Carbamylcholinchlorid, Sigma Aldrich Chemie GmbH
- l-Nitro-Arginin, Sigma Aldrich Chemie GmbH
- Endotoxin, Sigma Aldrich Chemie GmbH, L2630, E. coli Serotyp 0111:B4

### 2.1.3 Organbad



**Abb. 7:** Laborarbeitsplatz



**Abb. 8:** Organbad

### **2.1.4 Versuchstiere**

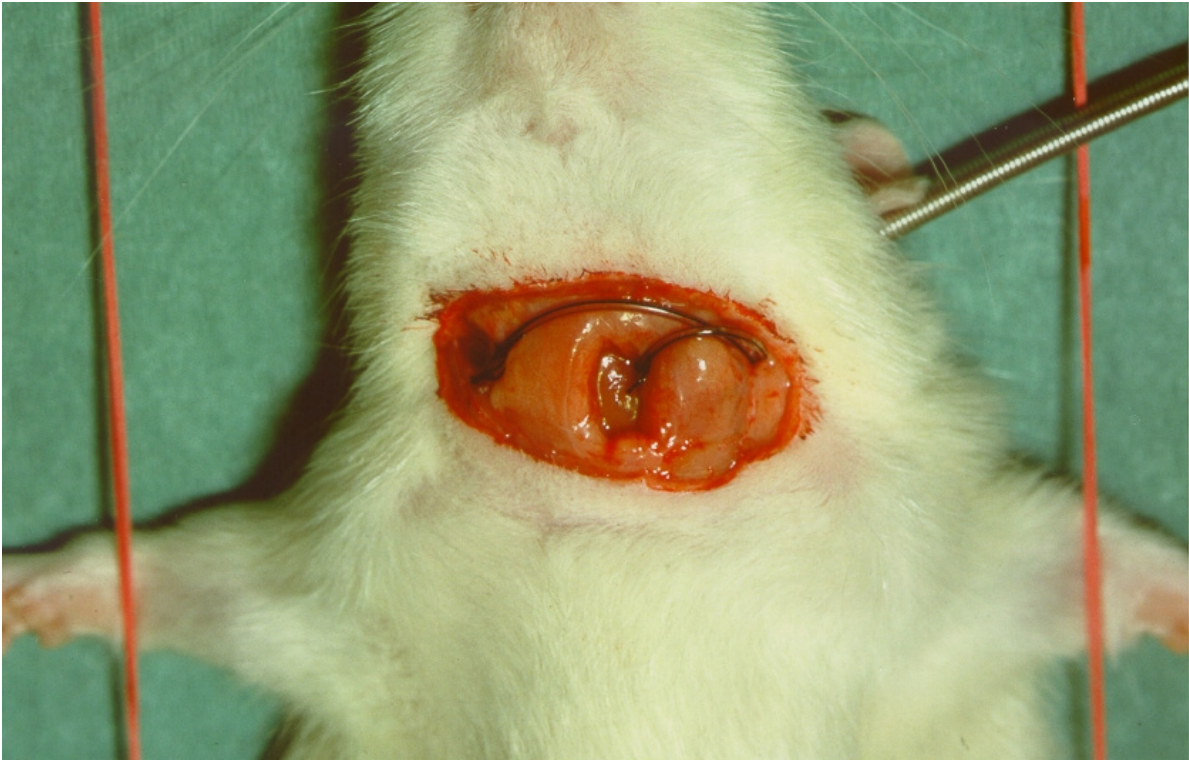
Männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 270g und 410g werden für die Untersuchungen verwendet. Sie werden in Standardkäfigen in Gruppen mit je 5 Ratten gehalten. Die Raumtemperatur beträgt etwa 20°C und die Luftfeuchtigkeit liegt bei ca. 60%. Der Raum unterliegt einem 12h/12h-Hell-/Dunkelzyklus. Die Tiere bekommen Altromin-Futter und Wasser ad libitum.

Die Tierversuchsgenehmigung hat das Aktenzeichen: G 0267/96.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Induktion der ANP**

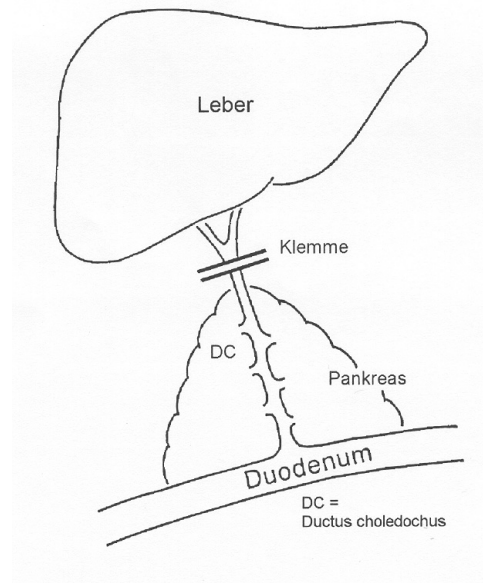
Die Narkoseeinleitung der Versuchstiere mit Aether in einem geschlossenen Glastopf durchgeführt. Zusätzlich bekommen die Tiere 1 mg/kgKG Ketanest 50 i.m. und 0,5 mg/kgKG Rompun 2% i.m. injiziert. Der Nacken, vordere Halsbereich und Bauch werden rasiert. Eine 2cm lange horizontale Inzision an der Vorderseite des Halses ermöglicht die Anlage des venösen Katheters. Hierzu wird der Katheter subcutan von dorsal nach ventral geführt und am Nacken zusammen mit einer sogenannten Führungshilfe festgenäht, die die Ratten daran hindert, den Katheter durchzunagen. Nach Präparation der rechten Vena jugularis interna wird diese nach kranial ligiert. Kaudal der Ligatur ermöglicht eine kleine Inzision in die Vene die Einführung des Katheters, der 2,6 cm in der Vene vorgeschoben und dort platziert wird. Die Fixation des Katheters wird nach Kontrolle der richtigen Lage durch Aspiration von Blut vorgenommen. Eine fortlaufende Naht verschließt die Halswunde.



**Abb. 9:** Jugularis-Katheter Implantation in der Ratte (Operationssitus)

Zur Induktion der Pankreatitis bei der Ratte wurde das Gallensalz-Modell nach Schmidt verwendet<sup>107,108</sup>. Bei diesem Modell wird mit einer minimalen Konzentration an intraduktalen Gallensäuren und einer intravenösen Hyperstimulation eine homogene nekrotisierende Pankreatitis mit einer mittelgradigen Verlaufsform produziert. Die Schädigung des Pankreasgewebes verläuft über mindestens 24 Stunden progressiv und die Mortalitätsrate ist auf 30-40% begrenzt. Somit stellt dieses Modell eine gute Möglichkeit dar, um neue Therapien zu untersuchen.

Das Öffnen des Abdomens erfolgt durch eine Oberbauchmedianlaparotomie entlang der Linea alba. Nach der Identifizierung des Duodenums und des gemeinsamen Gallengangs wird die Papille transduodenal sondiert. Mit einem Teflon-Katheter (Angiocath, 24-gauge, 1,9 cm) wird die Papille Vateri möglichst atraumatisch kanüliert. Gallen- und Pankreassekret können über 10 min ablaufen, indem die Operationsfläche um 45° angehoben wird. Das Entleeren der Gänge erleichtert das Infundieren der Glycodeoxycholin-Säure. Der Hauptast des Ductus hepaticus wird mit einer Klemme in der Nähe des Leberhilus abgeklemmt, damit die GDOC-Infusion ins Pankreas und nicht in die Leber laufen kann.

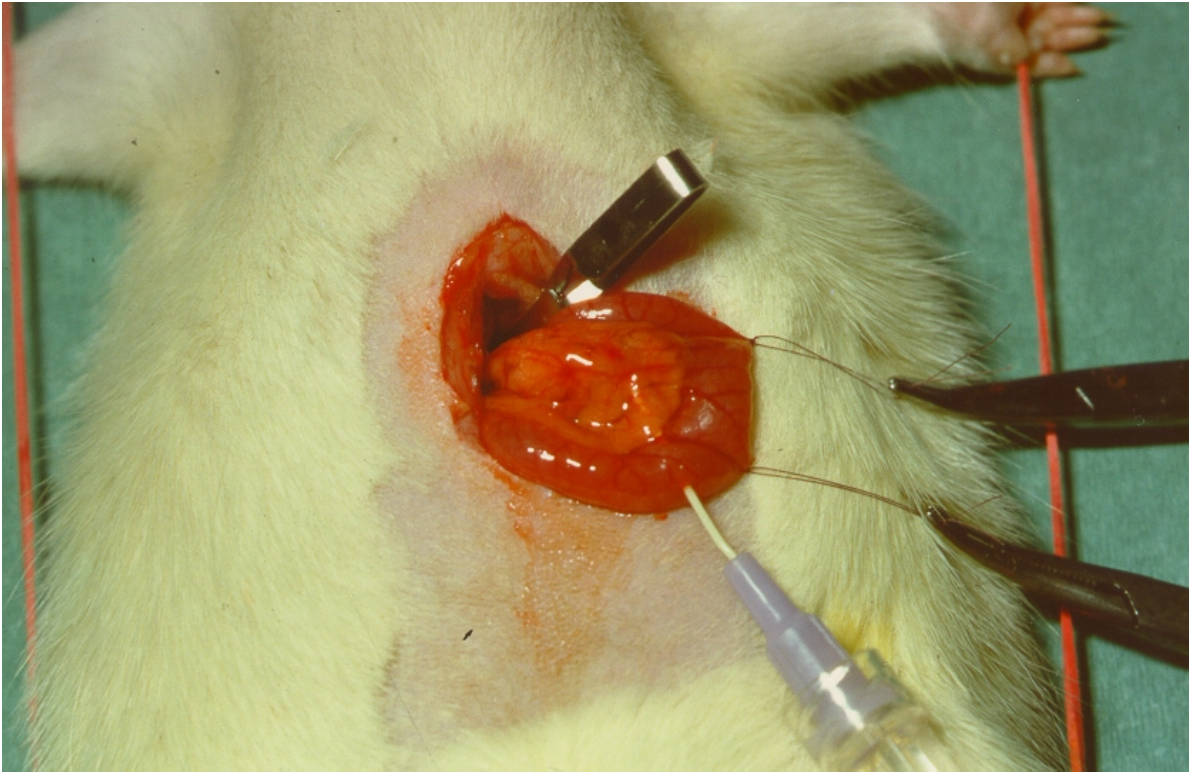


**Abb. 10:** Anatomie: Biliopankreatisches Gangsystem der Ratte und Position der Klemme<sup>102</sup>

Das GDOC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wird immer in einem Glycyl-Glycyl-Puffer (6,605g Glycyl-Glycyl + 0,294g CaCl<sub>2</sub> und mit NaOH auf einen pH=8 gebracht) frisch angesetzt. Die intraduktale GDOC-Infusion erfolgt druck-, zeit- und volumengesteuert, wobei der höchstzulässige Druck 30mmHg und die Laufzeit 10 Minuten betragen. Die Tiere bekommen insgesamt ein Volumen von 1,25mg/kg KG GDOC infundiert.

Nach Abschluss der Infusion wird das Abdomen zweischichtig mit einem 3.0 Suturamid Faden von Ethicon mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Danach folgt die intravenöse Infusion mit 5µg/kg/h Cerulein, 0,2ml Ketanest, 0,05ml/100gKG Bicarbonat gelöst in 0,2ml/100gKG NaCl, die über 6 Stunden läuft. Die Infusionsgeschwindigkeit beträgt dabei 2ml/kg/h. Durch die Infusion dieses Gemisches aus Pharmaka wird eine Hyperstimulation des Pankreas erreicht. 24 Stunden nach der GDOC-Infusion werden die Tiere durch intrakardiale Gabe von je 0,2ml T61, einem üblichen Mittel aus der Veterinärmedizin, getötet. Das T61 hat keinen Einfluss auf die Motilität des Darms, weshalb wir uns für diese Methode entschieden haben.





**Abb. 11:** Induktion der Pankreatitis: Klemme am Ductus choledochus; transduodenale Punktion der Papille Vateri (Operationssitus)

Die Kontrolltiere unterliegen den gleichen mechanischen Belastungen der Operation. Entsprechend der Ceruleininfusion der ANP-Tiere erhalten die Kontrolltiere allerdings keine Infusion in das Pankreas. Hier wird ebenfalls die Bauchdecke mit zwei fortlaufende Nähte (Ethicon, Suturamid 3/0) für die Muskel- und Hautschicht verschlossen.

Die beiden Gruppen, die zusätzlich einer Endotoxin-Behandlung ausgesetzt werden, erhalten direkt vor dem Bauchdeckenverschluss Lipopolysaccharide in einer Konzentration von 10mg/kgKG intraperitoneal appliziert.

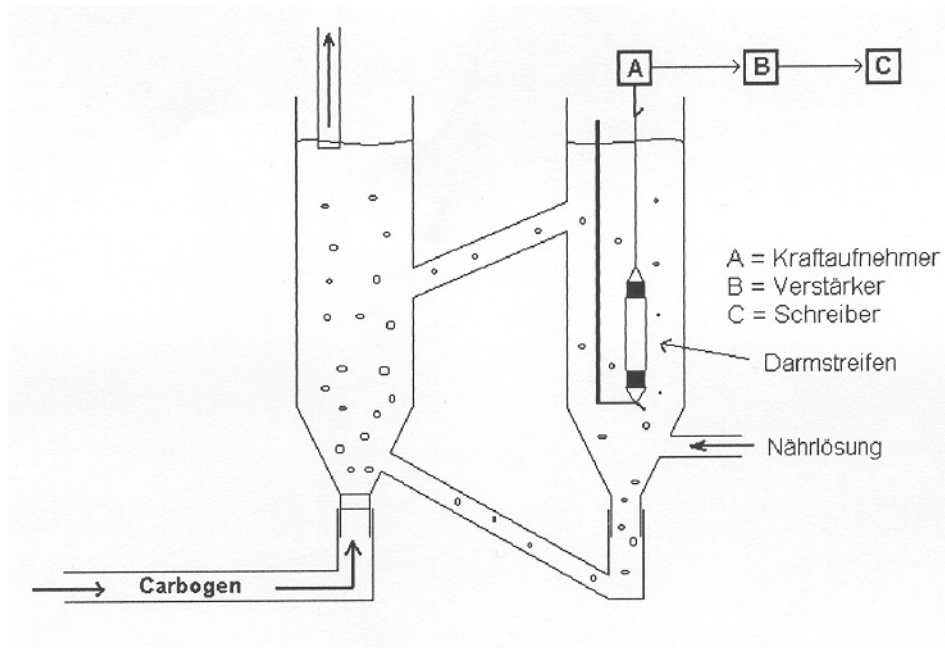
### **2.2.2 Präparation der Ileumsegmente**

Der Tod der Tiere wird durch intrakardiale Injektion von T61, wie es in der Veterinärmedizin eingesetzt wird, hervorgerufen. Danach kann das Abdomen relaparotomiert werden. Der gesamte Darm mit einschließlich des Pankreas wird zur weiteren Untersuchung entfernt. Zur Präparation werden Ileumsegmente gewählt, die etwa 10cm oral des Ileocaecalübergangs liegen. Entlang des Mesenterialansatzes werden diese der Länge nach eröffnet und als longitudinal orientierte Muskelstreifen mit einer Abmessung von 0,5cm x 1cm präpariert.

Ständiges Benetzen mit Nährlösung und Vermeidung mechanischer Alterationen sollen Schädigungen des Darms möglichst vermeiden.

### 2.2.3 Messapparatur

Die Kontraktilitätsmessung wird in einem 4-Kanal Organbad nach Schuler vorgenommen. Die präparierten Ileumsegmente werden dazu mit Hilfe von zwei Messingklammern im Organbad aufgespannt. Die untere Klammer hängt fix an ihrem Haken kurz oberhalb des Gefäßbodens. Die obere Klammer dagegen ist mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Dieser ist an einen vertikal arbeitenden Feintrieb gekoppelt, über den die mechanische Vorspannung auf die Präparate vor Versuchsbeginn gegeben werden kann. Mit dieser Apparatur werden isometrische Kraftänderungen gemessen. Die mechanischen Effekte werden vom Kraftaufnehmer in elektrische Signale umgewandelt und nach Verstärkung durch einen Amplifier an einen graphischen Schreiber weitergegeben. Mit diesem Schreiber können simultan vier Streifen registriert werden.



**Abb. 12:** Schema des Organbads

Jede der vier Perfusionskammern des Organbads enthält 40ml einer Ringer-Lösung, die folgende Zusammensetzung hat:

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Organbadlösung

	NaCl	KCl	Ca <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mg <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Glucose
mmol/l	120,3	5,9	2,5	1,2	15,4	1,2	11,5
g/mol	58,43	74,56	147,02	203,3	84,01	156	198,18
g	70	4,4	3,37	2,44	17,94	1,87	22,9

Die Lösung in den Kammern wird kontinuierlich mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) durchperlt. Ein externer Wasserkreislauf hält die Temperatur auf 37°C. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7,4. Mit diesem Versuchsaufbau werden standardisierte Bedingungen erreicht.

#### 2.2.4 Versuchsdurchführung

Zwei Ileumsegmente von jedem Versuchstier werden in der oben angegebenen Weise präpariert und in die Perfusionskammer gehängt. Die Messapparatur wird vor jedem Versuch kalibriert und mit Hilfe von 1g Eichgewichten geeicht. Danach folgt die mechanische Vorspannung der Präparate auf 0,5g und eine halbstündige Äquilibrationsphase.

Carbachol in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mmol/l stimuliert den Darm über die ersten 10 Minuten und erzeugt so die erste Kontraktion. Nach dieser Kontraktion werden die Perfusionskammern in zwei Etappen mit je 1 Liter frischer Nährlösung über einen Zeitraum von 10 Minuten gespült, um das Carbachol auszuwaschen. Nach weiteren 10 Minuten erfolgt die zweite Kontraktion in der selben Weise, wie die vorangegangene. Der Spülvorgang ist ebenfalls derselbe. Es folgt dann eine Ruhephase über 15 Minuten, in denen sich die Präparate erholen können. Die dritte Kontraktion ist eine submaximale Kontraktion, ausgelöst durch Carbachol in einer Konzentration von  $3,2 \times 10^{-7}$  mol/l. Die Registrierung der Kräfte findet über 5 Minuten statt, bevor der NO-Antagonist L-NAG in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l zugegeben wird. Die Kraftaufzeichnung wird wieder über 10 Minuten geführt.

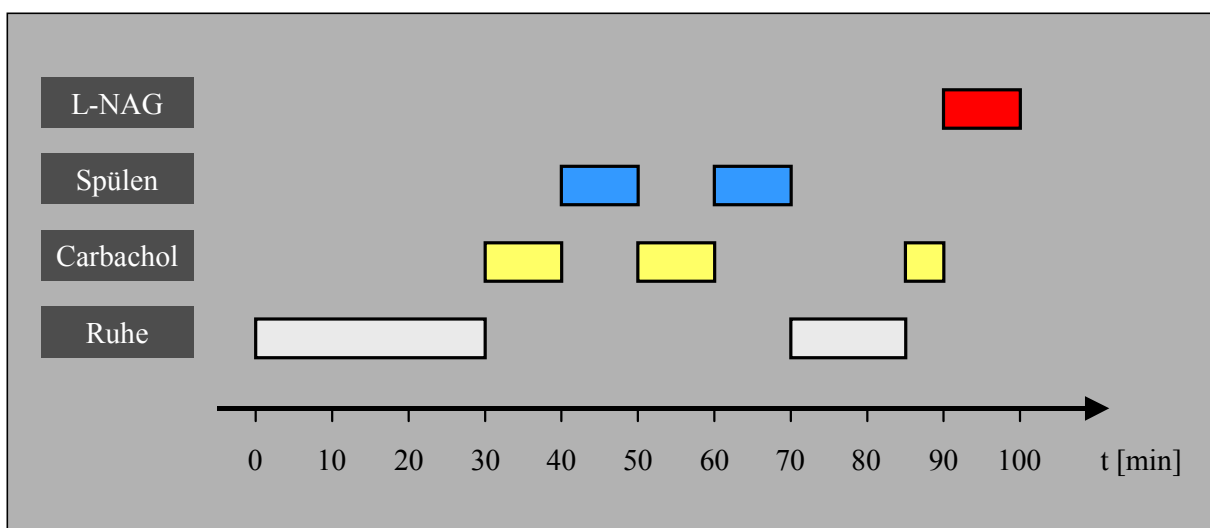


Folgende Gruppen werden nach Stimulation mit Carbachol in vitro miteinander verglichen:

**Tabelle 4:** Versuchseinteilung (4 Gruppen); ANP = akut-nekrotisierende Pankreatitis  
LPS = Lipopolysaccharide; pro Gruppe werden 12 Darmsegmente untersucht

ANP	vs	Kontrolle
Kontrolle	vs	Kontrolle + LPS
ANP	vs	ANP + LPS
ANP + LPS	vs	Kontrolle + LPS

Nach der Zugabe des l-Nitro-Arginins in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mmol/l in vitro werden dieselben Gruppierungen gewählt.



**Abb. 13:** Übersicht über den Versuchsablauf

### 2.2.5 Auswertmethode der Kurven

Um eine Aussage über die reine Kraftentwicklung der Darmabschnitte machen zu können, muss der Ruhe- oder Basiswert, der dem Wert der mechanischen Vorspannung entspricht, jeweils von den entsprechenden gemessenen Werten, den Kontraktionen und den Messwerten nach Substanzzugabe, abgezogen werden. Alle Werte werden jeweils durch eine in die Messkurve gelegte Linie ermittelt. Der Basiswert wird jeweils 1 Minute vor Zugabe des Carbachols, gleich welcher Konzentration, bestimmt. Der Wert der Carbachol-induzierten

Kraft wird zwischen der 1. und 2. Minute abgelesen. Die Ermittlung der Daten nach Substanzzugabe erfolgt immer in zweiminütigem Abstand.

### 2.2.6 Beurteilung der Gewebeprobe

Um die akut nekrotisierende Pankreatitis, die durch unsere Methode erzeugt wird, zu verifizieren, werden die Präparate histologisch untersucht. Dazu werden 3 repräsentative Stichproben aus jeder Gruppe entnommen und in Formalin fixiert. Die Schnitte in einer Dicke von 5 µm werden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und beurteilt.

### 2.2.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Daten erfolgt PC-unterstützt mit dem Statistikprogramm SPSS 7.5 für Windows 95. Die Statistik wird nach Beratung mit Frau Dipl.-Soz. S. Bisson durch die Abteilung für medizinische Statistik, Epidemiologie und Informatik erstellt. Es werden immer die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt.

Die Korrelationen zwischen dem Tiergewicht und der Kontraktionskraft der einzelnen Kontraktionen wird mit dem Spearman-Rho-Test geprüft. Mit dem Shapiro-Wilk-Test werden die Daten der ersten, zweiten und dritten Kontraktion und die der Messwerte nach Substanzzugabe auf ihre Normalverteilung hin getestet.

Zum Gruppenvergleich wird der t-Test für ungepaarte Stichproben herangezogen. Dazu werden die Daten der 1. Kontraktion, 2. Kontraktion, 3. Kontraktion und die jeweiligen Messwerte nach Substanzzugabe miteinander verglichen.

**Tabelle 5:** Gruppierungen bei Anwendung des t-Tests für ungepaarte Stichproben

ANP-Tiere	vs	Kontrolltiere
ANP-Tiere mit Endotoxin	vs	Kontrolltiere mit Endotoxin
ANP-Tiere	vs	ANP-Tiere mit Endotoxin
Kontrolltiere	vs	Kontrolltiere mit Endotoxin

Um die Unterschiede, die durch den NO-Antagonisten L-NAG ausgelöst werden zu testen, wird der t-Test für abhängige Variablen herangezogen. Dazu werden in jeder Gruppe die Werte der 3. Kontraktion und der Messwert nach 2 Minuten, der Messwert nach 2 Minuten und nach 4 Minuten, nach 4 Minuten und nach 6 Minuten, nach 6 Minuten und nach 8 Minuten, sowie der Messwert nach 8 Minuten und nach 10 Minuten beurteilt.

**Tabelle 6:** Gruppierung bei Anwendung des t-Tests für abhängige Variablen

3. Kontraktion	vs	Messwert nach 2 Minuten
Messwert nach 2 Minuten	vs	Messwert nach 4 Minuten
Messwert nach 4 Minuten	vs	Messwert nach 6 Minuten
Messwert nach 6 Minuten	vs	Messwert nach 8 Minuten
Messwert nach 8 Minuten	vs	Messwert nach 10 Minuten

