

2. Methodik

Alle Versuche wurden am isolierten perfundierten Rattenherzen durchgeführt. Hierbei wurde ein modifiziertes Modell des isolierten Rattenherzens von Langendorff und Mitarbeitern (1895) verwandt.

2.1 Präparation zur Isolierung des Rattenherzens

In die Versuchsreihe wurden ausschließlich männliche Wistar-Kyoto-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 220g und 380g eingeschlossen. Nach intraperitonealer Heparinisierung (1000 i.E./Kg Körpergewicht) und intraperitonealer Anästhesie mit Urethan ($1,4 \text{ g} \times \text{Kg}^{-1}$ Körpergewicht) wurde das Abdomen über einen Unterbauch-Medianschnitt eröffnet. Von kaudal wurde eine Thorakotomie bis zum Hals durchgeführt. Es zeigte sich eine freie Sicht ins Mediastinum und auf das noch schlagende Herz. Um die Herzfrequenz und Kontraktilität zu senken, wurde das Herz sofort mit eiskalter, oxigenierte Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) umspült. Die Aorta ascendens wurde sorgfältig vom umliegenden Thymus-, Fett- und Bindegewebe getrennt. Eine Ligatur wurde hinter der Aorta platziert. Die Vorderwand der Aorta ascendens wurde mit einer Mikroschere quer inzidiert. Über die Inzision wurde eine Knopfkanüle (Länge: 8cm, Innendurchmesser: 1,6mm, Aussendurchmesser: 3,2mm) in den proximalen Teil der Aorta vorsichtig eingeführt. Die Ligatur wurde dicht verschlossen. Um eine Thrombosierung der Koronargefäße zu verhindern, wurden nun über die Knopfkanüle 500 i.E. Heparin injiziert.

Abschließend wurde das Herz sauber herausgetrennt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Über den Katheter wurde die Aorta ascendens retrograd mit physiologischer Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert, was zu dem Schließen der Aortenklappen führte. Daraus resultierte eine Perfusion der Koronararterien, die oberhalb der Aortenklappen aus der Aorta ascendens entspringen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung, pH 7,4

Komponente	Konzentration
NaCl	112 mM
NaHCO ₃	25 mM
MgSO ₄	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,2 mM
D-Glukose	11 mM

2.2 Perfusionssystem

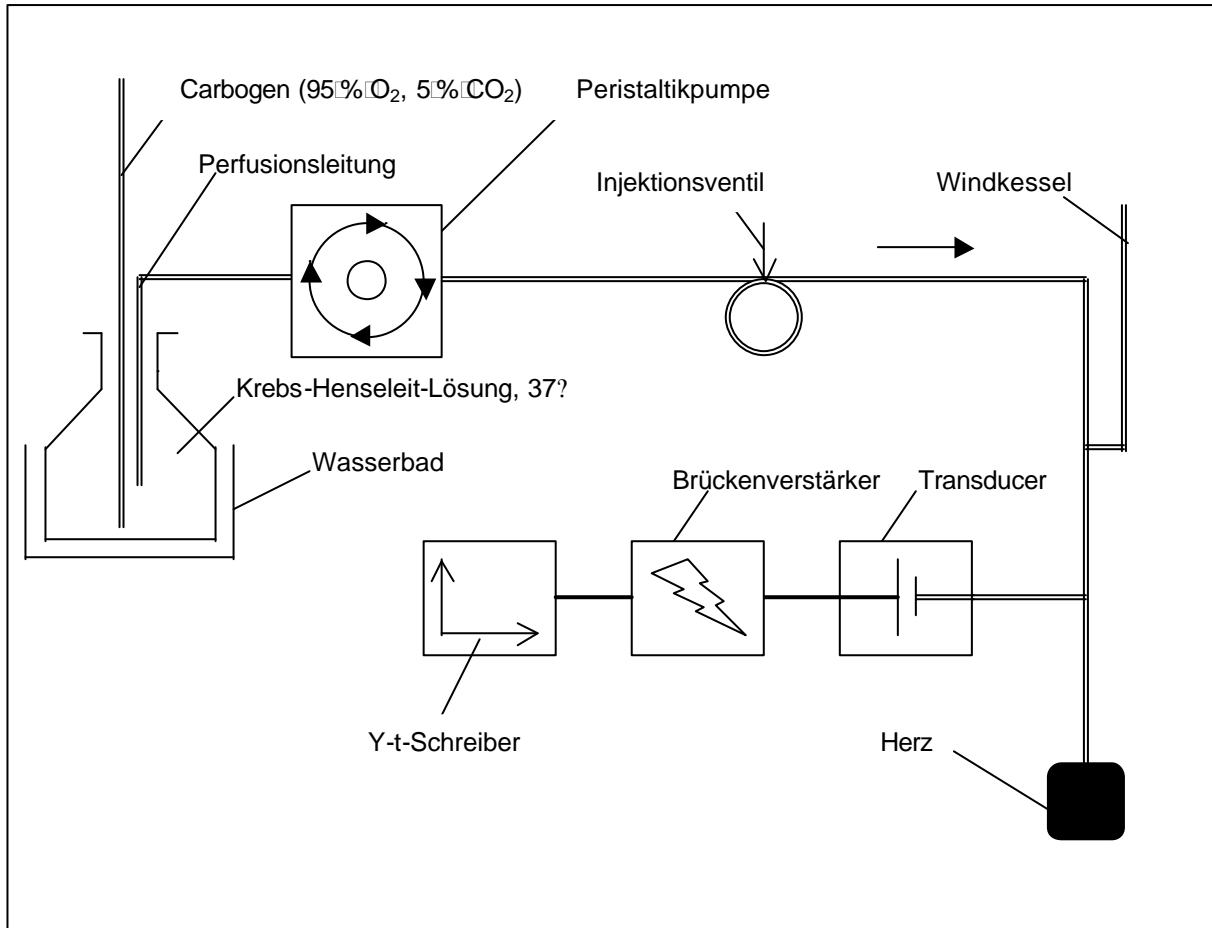


Abbildung 3: Schematische Darstellung des isolierten perfundierten Rattenherzens

Die im Wasserbad auf 37°C erhitzte und mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂) begaste Krebs-Henseleit-Lösung wurde durch eine Peristaltikpumpe in das Rattenherz gepumpt. Es wurde ein Injektionsventil in Reihe geschaltet, über das man Substanzen in Bolusform in das Herz applizieren konnte. Ein parallel geschalteter Windkessel sorgte für einen konstanten Perfusionsdruck. Ein parallel geschalteter Druckaufnehmer (Transducer) wandelte Druckänderungen in den Koronargefäßen in elektrische Signale um. Diese Signale wurden durch einen Brückenverstärker verstärkt und mit einem Y-t-Schreiber aufgezeichnet.

Die Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau der isolierten perfundierten Rattenherzapparatur. Die Koronararterien konnten mit Hilfe dieses Systems über die Knopfkanüle, in Anlehnung an die Langendorff-Methode (1895), retrograd über die Aorta ascendens perfundiert werden. Zunächst wurde Krebs-Henseleit-Lösung (siehe Tabelle 3) in einem Wasserbad so erwärmt, dass das in den Koronargefäßen ankommende Perfusat eine Temperatur von 37°C aufwies. Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde ständig mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Es wurde eine Peristaltikpumpe (Ismatec BVP, Glattbrugg, CH) verwendet, um einen Perfusionsdruck von annähernd 60 mmHg in den Koronararterien zu erreichen. Druckschwankungen der Peristaltikpumpe wurden über einen parallel geschalteten Windkessel ausgeglichen, so dass ein relativ konstanter Perfusionsdruck erzielt werden konnte. In den Koronararterien auftretende Druckänderungen wurden mittels eines Druckaufnehmers (Statham Transducer P23Gb, Siemens), der in einen Seitenarm des Perfusionssystems eingeschaltet war, registriert und in elektrische Signale umgewandelt. Die Signale wurden mit Hilfe eines Brückenverstärkers (Hugo Sachs, Freiburg, Deutschland) verstärkt und mit einem Y-t-Schreiber (Polygraph der Firma Rikadenki) aufgezeichnet. Testsubstanzen konnten über eine Injektionsschleife, die zwischen Peristaltikpumpe und isoliertem perfundiertem Rattenherzen interponiert war, als Bolusgabe (100 µl Reservoir) dem System appliziert werden.

2.3 Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Koronarendothels

Nachdem das Herz an das Perfusionssystem angeschlossen wurde, wurde zunächst eine Äquilibrierungsphase von 30 Minuten abgewartet bis das Herz einen konstanten Perfusionsdruck erreicht hatte. Der Perfusionsdruck wurde über die Peristaltikpumpe auf 60 mmHg eingestellt. Vor jedem Versuch wurde die Funktion des Koronarendothels des Präparates mit Hilfe von Bolusapplikationen von Natriumnitroprussid (SNP, 10 µmol) und Acetylcholin (Ach, 10 µmol) kontrolliert. SNP hat eine endothelunabhängige Vasodilatation über direkte NO-Abspaltung zur Folge. Ach führt zu einer endothelabhängigen Vasodilatation über Freisetzung von NO aus der Endothelzelle. Kam es bei der Funktionsüberprüfung des Endothels zu einer Vasodilatation der Koronargefäße bei der Applikation von SNP, nicht jedoch bei Ach, wurde von einer Schädigung des Koronarendothels ausgegangen und der Versuch abgebrochen. Um artifizielle Reaktionen der Koronargefäße auszuschliessen, wurden Applikationen von Krebs-Henseleit-Lösung durchgeführt, die keine Änderung des Perfusionsdrucks zur Folge hatten.

2.4 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Es wurden für Ap_5A , Ap_6A , Ap_5G , Ap_6G , α,β -Methyladenosin-5'-triphosphat (α,β -meATP), 2-Methylthioadenosin-5'-triphosphat (2-meSATP) und 2-Chloroadenosin-5'-triphosphat (2-ClATP) Dosis-Wirkungskurven erstellt. Sämtliche Substanzen wurden in Krebs-Henseleit-Lösung gelöst und als Bolusinjektionen in aufsteigenden Dosen appliziert. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde jeweils ein Erholungszeitraum von fünf

Minuten eingehalten, um eine Desensitisierung des Rezeptors auszuschließen. Diese Methode erlaubte, Dosis-Wirkungs-Kurven von verschiedenen Agonisten am gleichen Präparat zu erstellen. Die Dinukleosidpolyphosphate (Xp_nX ; $X \neq A/G$, $n = 5 \& 6$) wurden in den Konzentrationen von $10^{-10} M$ bis $10^{-8} M$, α, β -meATP, 2-meSATP, 2-ClATP und ATP in den Konzentrationen $10^{-11} M$ bis $10^{-8} M$ appliziert.

2.5 Dauerperfusionen mit Antagonisten und Agonisten

2.5.1 Dauerperfusion mit NO-Synthase-Hemmern

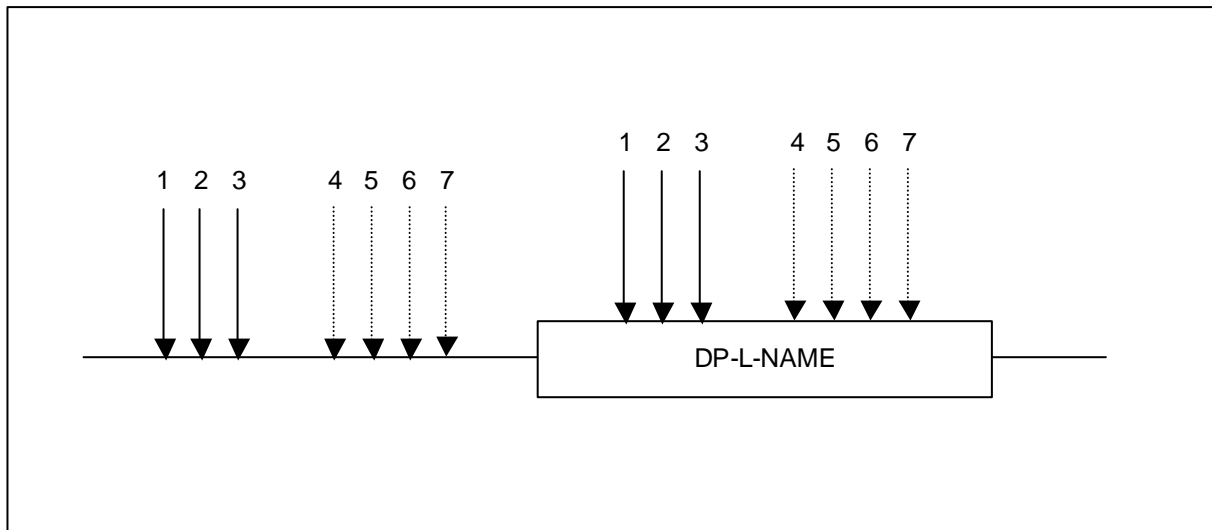


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dauerperfusion mit NO-Synthasehemmern

Gerade = Krebs-Henseleit-Lösung, einfach gerahmter Block = Dauerperfusion (DP) mit Krebs-Henseleit-Lösung + $10\ \mu\text{M}$ L-NAME (DP-L-NAME), durchgezogener Pfeil = einmalige Bolusinjektionen von Agonisten (1-3), gestrichelter Pfeil = Bolusinjektionen von Agonisten verschiedener Konzentrationen zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven (4-7); nachdem das Herz an das Perfusionssystem angeschlossen und ein konstanter Perfusionsdruck erreicht wurde, wurden verschiedene Agonisten appliziert: (1) ADP , (2) ACh , (3) SNP , (4) Ap_5A , (5) Ap_6A , (6) Ap_5G und (7) Ap_6G . Die erste Dauerperfusion (DP-L-NAME) wurde angeschlossen und 30 min abgewartet. Erneut wurden die Agonisten 1-7 als Bolus dem System appliziert.

Mit diesem Versuchsaufbau konnte die Abhängigkeit der Vasoaktivität verschiedener Agonisten von der

endothelabhängigen NO-Synthase untersucht werden. Nachdem das isolierte Herz im Perfusionssystem einen konstanten Druck aufgebaut hatte, wurden zunächst (1) 10^{-11} mol α, β -meATP, (2) 10^{-11} mol Ach, und (3) 10^{-11} mol SNP dem Herzen appliziert. Die Agonisten (4) Ap_5A , (5) Ap_6A , (6) Ap_5G und (7) Ap_6G wurden jeweils in den Konzentrationen 10^{-11} mol bis 10^{-8} mol injiziert. Zwischen den einzelnen Bolusinjektionen wurde jeweils fünf Minuten abgewartet bis wieder ein konstanter Perfusionsdruck erreicht wurde. Um eine irreversible Hemmung der NO-Synthase zu erreichen, wurde eine Dauerperfusionslösung mit 10^{-6} M N^G -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) hergestellt. L-NAME ist vollständig Krebs-Henseleit löslich. Die Dauerperfusionslösung wurde mit Carbogen begast, auf $37^\circ C$ erhitzt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Um eine optimale Blockade zu erreichen, wurde das Herz 30 Minuten mit dem Antagonisten perfundiert. Die Agonisten (1) α, β -meATP, (2) Ach, (3) SNP, (4) Ap_5A , (5) Ap_6A , (6) Ap_5G und (7) Ap_6G wurden nun erneut nacheinander und in den angegebenen Konzentrationen als Bolus dem Herz appliziert. Die Blockade der NO-Synthase konnte anhand der Bolusinjektion von Ach (Agonist 2) und SNP (Agonist 4) überprüft werden, wobei man für Ach eine Hemmung der vasodilatativen Wirkung erwartete und für SNP nicht. Vasokonstriktionen nach α, β -meATP-Applikation sind vor und nach Blockade der NO-Synthase zu erwarten.

2.5.2 Deendothelialisierung und Desensitisierung des P_{2x1} -Rezeptors

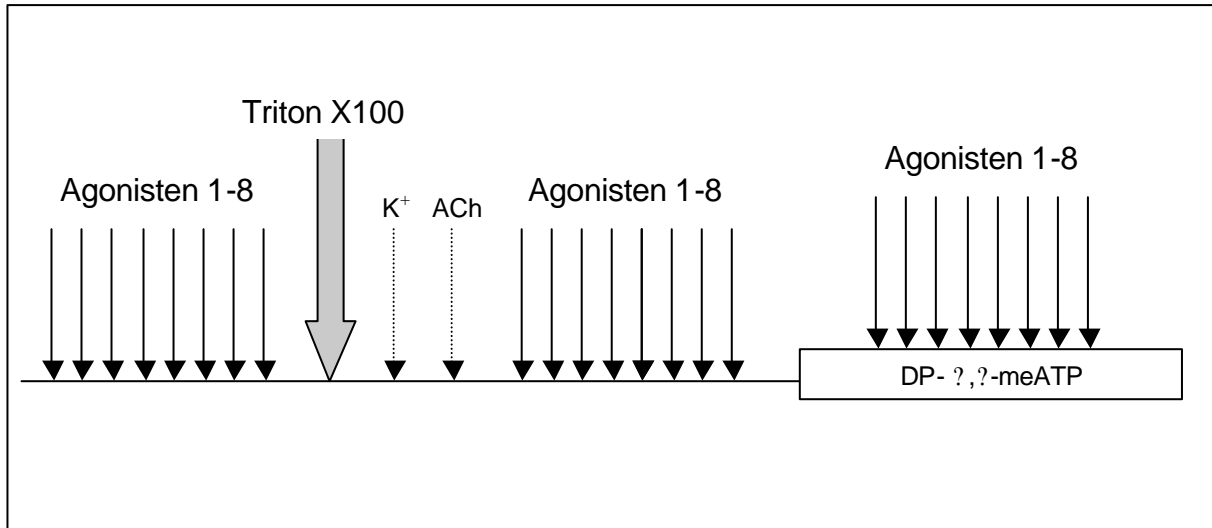


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Deendothelialisierung der Koronararterien und Desensitisierung des P_{2x1} -Rezeptors

Gerade = Krebs-Henseleit-Lösung, einfach gerahmter Block = Dauerperfusion (DP) mit Krebs-Henseleit-Lösung + $1\ \mu\text{M}$ $?,?-\text{meATP}$ (DP- $?,?-\text{meATP}$), durchgezogener Pfeil = Bolusinjektionen verschiedener Agonisten (1-8), Blockpfeil = Deendothelialisierung mit Triton X100 (0,1%) über 5 Sekunden, gestrichelter Pfeil = Bolusinjektion von Kontrollsubstanzen nach Endothelialisierung (K^+ , ACh); nachdem das Herz an das Perfusionssystem angeschlossen und ein konstanter Perfusionsdruck erreicht wurde, applizierte man dem System Bolusgaben verschiedener Agonisten: (1) Ap_5A , (2) Ap_5G , (3) Ap_6A , (4) Ap_6G , (5) $?,?-\text{meATP}$, (6) 2-meSATP , (7) 2-CIATP und (8) SNP . Mittels Triton X100 wurde das Endothel zerstört. Nach einmaliger K^+ - und ACh-Applikation zur Funktionskontrolle des Gefäßes wurden die Agonisten 1-8 als Bolus dem System zugeführt. Danach schaltete man auf die Dauerperfusion (DP- $?,?-\text{meATP}$) um. Die Agonisten 1-8 wurden erneut als Bolus injiziert.

Mit dieser Versuchskonstellation konnte die Abhängigkeit der Vasodilatationen, induziert durch verschiedene Agonisten, von dem Endothel und die der Vasokonstriktionen vom P_{2x1} -Rezeptor untersucht werden. Nach Erreichen des Druckäquilibrium im Herzen wurden zunächst Bolusapplikationen ($10\ \mu\text{mol}$) von (1) Ap_5A , (2) Ap_5G , (3) Ap_6A , (4) Ap_6G , (5) $\alpha, \beta\text{-meATP}$, (6) 2-meSATP , (7) 2-ClATP und (8) SNP durchgeführt. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde eine Erholungsphase von mindestens 5 Minuten eingehalten. Um das Endothel der Koronargefäße vollständig zu zerstören, wurde eine 0,1%ige Lösung von *t*-Octyl-phenoxyethoxyethanol (Triton X100) in Krebs-Henseleit-Lösung hergestellt. Triton X100 ist eine oberflächenaktive Substanz, die in der Lage ist, das Endothel ohne Schädigung der Muskularis der Koronargefäße zu zerstören. Eine Dauerperfusion von genau fünf Sekunden wurde durchgeführt. Um die Unversehrtheit der Muskelschicht zu prüfen, wurde eine K^+ -Bolusapplikation ($130\ \text{mM}$) durchgeführt, was zu einer Kontraktion des Gefäßes führt. Die Entfernung des Endothels wurde mit Applikation von ACh, das nach kompletter Entfernung des Endothel keine Vasodilatation mehr auslösen kann, überprüft. SNP hat durch direkte NO -Abspaltung weiterhin vasodilatative Wirkung. Erneut wurden die Agonisten (1) Ap_5A , (2) Ap_5G , (3) Ap_6A , (4) Ap_6G , (5) $\alpha, \beta\text{-meATP}$, (6) 2-meSATP , (7) 2-ClATP und (8) SNP dem System appliziert. Anschließend wurde der P_{2x1} -Rezeptor mit einer $\alpha, \beta\text{-meATP}$ -Dauerperfusion ($\text{DP-}\alpha, \beta\text{-meATP}$, $1\ \mu\text{M}$) desensibilisiert. Um eine optimale Desensibilisierung zu erreichen, wurde das Herz für 20 Minuten mit dem Rezeptoragonisten perfundiert. Die Reihe der Agonisten wurde wieder in Abständen von fünf Minuten in das System injiziert.

2.5.3 Dauerperfusion mit P_{2y1} - und P_{2x} -Rezeptorantagonisten

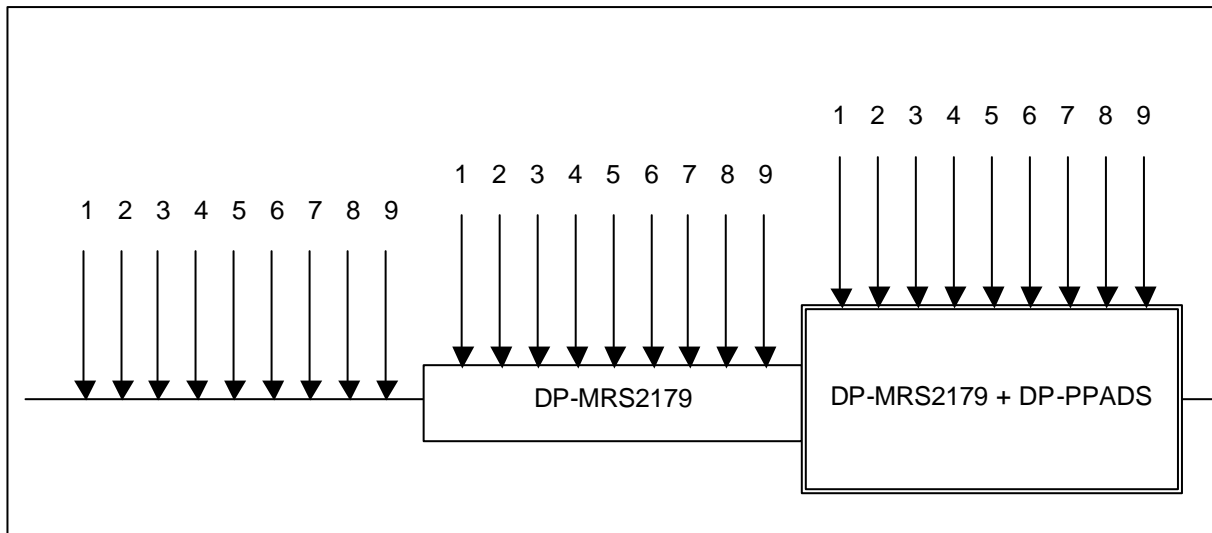


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Dauerperfusion mit P_{2y1} - und P_{2x} -Rezeptorantagonisten

Gerade = Krebs-Henseleit-Lösung, einfach gerahmter Block = Dauerperfusion (DP) mit Krebs-Henseleit-Lösung + $1\mu\text{M}$ MRS2179 (DP-MRS2179), doppelt gerahmter Block = Dauerperfusion mit $1\mu\text{M}$ MRS2179 und $10\mu\text{M}$ Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'-4'-disulfonsäure (DP-MRS2179+DP-PPADS), Pfeil = Bolusinjektionen verschiedener Agonisten: (1) Ap_5A , (2) Ap_6A , (3) Ap_5G , (4) Ap_6G , (5) 2-meATP , (6) 2-meSATP , (7) 2CIATP , (8) SNP und (9) ACh ; nachdem das Herz an das Perfusionssystem angeschlossen und ein konstanter Perfusionsdruck erreicht wurde, applizierte man dem System Bolusgaben der Agonisten 1-9. Die erste Dauerperfusion (DP-MRS2179) wurde angeschlossen. Wieder wurden die Agonisten 1-9 als Bolus dem System zugeführt. Danach schaltete man auf die zweite Dauerperfusion (DP-MRS2179 + DP-PPADS) um. Die Agonisten 1-9 wurden erneut als Bolus injiziert.

Mit diesem Versuchsaufbau untersuchte man die Abhängigkeit der Wirkung verschiedener Agonisten von den P_{2Y1} - und P_{2X} -Rezeptoren. Zunächst wurde dem mit Krebs-Henseleit perfundierten Herz 10 nmol Boli der Agonisten (1) AP_5A , (2) AP_6A , (3) AP_5G , (4) AP_6G , (5) α, β -meATP, (6) 2-meSATP, (7) 2ClATP, (8) SNP und (9) Ach in Abständen von jeweils 5 Minuten appliziert. Die Blockade der Purinrezeptoren wurde durch den spezifischen P_{2Y1} -Rezeptorantagonisten MRS2179 (1 μ M) und den spezifischen P_{2X} -Rezeptorantagonisten Pyridoxal-Phosphat-6-azophenyl-2,4-Disulphonat (PPADS 10 μ M) erreicht. Beide Substanzen sind in Krebs-Henseleit-Lösung gut löslich. Nach dem Anlegen einer mit Carbogen begasten und auf 37°C erwärmten Dauerperfusion wurde jeweils 30 Minuten gewartet, um eine optimale Hemmung der jeweiligen Rezeptoren zu gewährleisten. Zuerst wurde mit einer Dauerperfusion mit 1 μ M MRS2179 begonnen. Die Agonisten (1) AP_5A , (2) AP_6A , (3) AP_5G , (4) AP_6G , (5) α, β -meATP, (6) 2-meSATP, (7) 2ClATP, (8) SNP und (9) Ach wurden dem Herzen als Bolus injiziert. Im letzten Versuchsteil wurde eine Dauerperfusion mit 1 μ M MRS2179 und 10 μ M PPADS angelegt und die Agonisten 1-9 erneut als Bolus zugeführt.

2.6 Materialien

Alle Dinukleosidphosphate (Xp_nX ; $X = A/G$, $n = 5&6$), α, β -meATP, Adenosin, 2-meSATP, 2-ClATP, Ach, ATP und SNP wurden als 100 μ l Bolusinjektionen über eine Sammelschleife (mit Injektionsventil) proximal des Präparates injiziert. Alle verwendeten Substanzen wurden täglich frisch aus einer Stammlösung (10 mM, tiefgefrorene Konzentrate) in zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Heparin, PPADS, MRS2179, Triton X100, ATP, α, β -meATP und 2-ClATP wurden von Research Biochemicals Inc., Deisenhofen, bezogen. Ap₅A und Ap₆A wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, bezogen und, wie durch Heidenreich und Mitarbeiter 1995 beschrieben, aufgereinigt. Ap₅G, Gp₅G, Ap₆G Gp₆G wurden nach der Methode von Schlüter et al. (1998) synthetisiert und aufgereinigt. Die synthetisierten und aufgereinigten Substanzen wurden von PD Dr. rer. Nat Schlüter (Berlin) zu Verfügung gestellt.

2.7 Statistik

Die Effekte wurden als Perfusionsdruckänderungen (in mmHg) registriert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung (SEM = standard error mean) dargestellt. Die Ergebnisse aus den Dauerperfusionsexperimenten mit L-NAME, MRS2179, PPADS, α, β -meATP und die Ergebnisse der Deendothelialisierungsexperimente stellen Gruppen von unverbundenen Stichproben mit potentiell 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 Perfusionsmittelwerte der Testsubstanzen unter Dauerperfusion mit den Antagonisten den Perfusionsmittelwerten der Testsubstanzen unter Krebs-Henseleit entsprechen. Als Alternativhypothese H_1 wurde angenommen, dass unter der Dauerperfusion die Perfusionsdruckmittelwerte größer oder kleiner wären, als unter Krebs-Henseleit.

$H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 > \mu_2$ oder $\mu_1 < \mu_2$

μ_1 = Perfusionsdruckmittelwert nach Applikation einer Testsubstanz unter Krebs-Henseleit

μ_2 = Perfusionsdruckmittelwert nach Applikation einer Testsubstanz unter Dauerperfusion mit L-NAME, MRS2179, PPADS, α, β -meATP oder nach Deendothelialisierung

Der Stichprobenumfang über Krebs-Henseleit betrug n_1 und über der jeweiligen Dauerperfusion n_2 . Es wurde eine Rangordnung der erhaltenen Perfusionsdrücke erstellt und den einzelnen Messwerten wurden Rangzahlen zugeordnet. Die Summe der

Rangzahlen der Messwerte über Krebs-Henseleit war R_1 und die Summe der Rangzahlen über der jeweiligen Dauerperfusion R_2 . Die in diesem Test verwendeten Prüfgrößen U_1 und U_2 errechneten sich folgendermaßen:

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

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

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. Als Auswertungs- und Dokumentationssoftware wurde das Programm Graph Pad Prism der Firma Graph Pad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, U.S.A. verwendet.