

B Material und Methoden

1. Studienprotokoll:

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden Richtlinien zur Pflege und Nutzung von Labortieren durchgeführt. Der Diabetes wurde bei den Wistar-Ratten durch eine Schwanzvenen-Injektion von Streptozotocin (STZ) (60 mg/ kg Körpergewicht) induziert. Zur Verifizierung des Diabetes wurde die Plasma-Glukose-Konzentration herangezogen. Nur Ratten mit einer Glukose-Konzentration im Plasma von über 15 mmol/l wurden in die STZ-Gruppen eingeschlossen. Ein Teil der diabetesinduzierten Ratten wurde mit dem ETA-Antagonisten LU135252, ein weiterer Teil mit dem kombinierten ETA/ETB-Antagonisten LU224332 behandelt, der Rest diente als Kontrolle. Den STZ-behandelten Tieren wurden nicht-diabetische Tiere als Kontrollen gegenübergestellt, die ebenfalls mit den entsprechenden Rezeptorantagonisten (LU135252 bzw. LU224332) oder gar nicht behandelt wurden. Alles in allem wurden also 6 Gruppen gebildet und untersucht:

- mit STZ behandelt (Diabetes induziert)

- I Kontrollgruppe
- II +LU135252 (selektiver ETA-Antagonist)
- III +LU224332 (kombinierter ETA/ETB-Antagonist)

- nicht mit STZ behandelt („gesunde“ Ratten)

- IV Kontrollgruppe
- V +LU135252 (selektiver ETA-Antagonist)
- VI +LU224332 (kombinierter ETA/ETB-Antagonist)

Die ET-Rezeptorantagonisten wurden in den entsprechenden Gruppen in einer Menge von 100mg/kg/die p.o. mit der Nahrung verabreicht, nachdem eine Vorabstudie gezeigt hatte, dass diese Dosierung bei Wistar-Ratten eine vollständige Blockade der Pressor-Antwort nach 200 ng ET-1 i.v. bewirkt.

Der Beobachtungszeitraum betrug 36 Wochen. Zu bestimmten Terminen (nach 1, 3, 6, 9, 12, 24 und 36 Wochen) wurden Parameter wie Körpergewicht, Urin-Volumina, Ausscheidung von Elektrolyten und Eiweiß bestimmt. Nach Abschluß der Beobachtungsphase wurden die Tiere getötet und die Nieren zur weiteren morphologischen Untersuchung entnommen. Dabei wurden für die Nieren das Ausmaß der Interstitiellen Fibrose, die Media/Lumen-Ratio sowie der Glomerulosklerose-Index bestimmt.

2. Material

2.1. Geräte

FLM-3 Flammenphotometer, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Autoanalyser Vitalab Selekttra, Merck

Autoanalyser Süßmex

Hitachi 717 Automated Analyzer

Mikrotom

Mikroskop, Zeiss, Jena

2.2. Materialien

ETA-Rezeptor-Antagonist LU135252

ETA/ETB-Rezeptor-Antagonist LU224332

(beide Stoffe wurden von der Knoll AG, Ludwigshafen erhalten)

Die übrigen Stoffe und Reagenzien wurden von Merck (Deutschland), Boehringer-Mannheim (Deutschland) oder Sigma (Deutschland) erhalten.

Aceton

Chloralhydrat

Eosinlösung 1%

Ethanol 70%, 80%, 90%, 96%, 100%

Hämatoxylin

HCl 0,01 N

Kaliumaluminiumsulfat

Kristalline Zitronensäure

Meyers Hämaunlösung

Natriumiodat

Perjodsäure 0,5 %

Pikrinsäure

Schiff'sches Reagenz

Sirius Red Farbstoff

Xylol

3. Methoden

3.1. Urinuntersuchung

Der Natrium- und Kaliumgehalt des Urins wurde mit einem Flammenphotometer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Testkit (pyrogallol red-molybdate complex reagent) in einem Hitachi 717 Analyzer automatisch gemessen.

Albumin wurde mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt. Anti-Ratten-Albumin (IgG-Fraktion) und Peroxidase-konjugiertes Anti-Ratten-Albumin (jeweils vom Kaninchen) wurden von Organon Teknika Cappel (West Chester, PA) bezogen und 10.000 bzw. 600 mal verdünnt. Durch Hitze inaktiviertes normales Kaninchenserum wurde als Blocker verwendet. Die Standardkurven waren zwischen 0,3 und 40 ng Albumin linear. Die Zugabe von bekannten Standard-Albumin-Mengen zu Urin ergab eine 97%ige Übereinstimmung der Messwerte mit den zugeführten Mengen.

Die endogene Kreatinin-Clearance wurde nach der Formel $C = \frac{U_c \times U_{vol}}{S_c}$ bestimmt. Dabei ist U_c die Kreatininkonzentration im Urin, S_c die Serumkreatininkonzentration und U_{vol} das Urinvolumen.

3.2. Histologische Methoden

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Organe in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom geschnitten (Schnittdicke 3µm) und verschiedenen Färbungen zugeführt:

Hämatoxylin-Eosin (HE)

Sirius Red

Periodsäure-Schiff'sche Färbung [PAS]

3.2.1. Fixierung

Prinzip

Ziel der Fixierung ist es, die nach dem Tode einsetzenden autolytischen Vorgänge zu verhindern und die Gewebestrukturen in möglichst natürlichem Zustand zu erhalten. Dabei kommt es notwendigerweise zu Veränderungen, die aber bei Standardisierung und Kenntnis der Technik eine Beurteilung der Zellzustände zulassen. Da diese Veränderungen reproduzierbar und einem entsprechenden Zustand in vivo zuzuordnen sind, werden sie als Äquivalenzbilder bezeichnet. Die Fixierung erfolgte in 4 %igem Formalin. Formaldehyd führt zur Ausbildung von Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine. Dadurch werden die Aminogruppen blockiert. Die Eiweißvernetzung hat eine bessere Erhaltung der Struktur zur Folge.

3.2.2. Paraffineinbettung

Prinzip

Um von den Organen für die Mikroskopie möglichst dünne Schnitte herstellen zu können, wird das Material eingebettet. Dazu wird zunächst die Fixierungsflüssigkeit ausgewaschen und dann das Gewebe mittels Alkohol vollständig entwässert. Soll die Einbettung in Paraffin erfolgen, so muss das Gewebe mit einer geeigneten Zwischenflüssigkeit (z.B. Xylol) behandelt werden, das sich sowohl mit der Entwässerungsflüssigkeit als auch mit dem Paraffin mischt.

Technik

Die Organe werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%-iges, 80%-iges, 2 x 96%-iges, 3 x absolutes Ethanol; jeweils 1 Stunde) und dann für 4 Stunden in Xylol übertragen, um den absoluten Alkohol zu entfernen. Dieser Schritt wird 2 mal mit frischem Xylol wiederholt. Dann werden die Organe für 1 Stunde in reines geschmolzenes Paraffin bei einer Temperatur von 56°C gegeben. Dieser Vorgang wird für 2 Stunden in einem 2. Paraffinbad wiederholt. Die beschriebenen Schritte werden über Nacht in der Histokinette automatisch durchgeführt.

Am nächsten Tag werden die Präparate in speziellen Formen (Tissue Tek Unikassetten) mit 56°C warmem Paraffin übergossen und sind nach dem Erkalten schnittfähig.

Das Schneiden der Präparate geschieht mit einem Mikrotom.

Die Schnittdicke der Präparate für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit betrug 3µm.

3.2.3. Färbungen:

3.2.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Prinzip

Bei dieser Färbung werden die Zellkerne mit einem basischen Farbstoff (Aluminium- oder Eisen-Hämatoxylin) blau gefärbt, die Rotfärbung des Zytoplasmas erfolgt mit einem sauren Farbstoff (Eosin).

Lösungen

70%-iges Ethanol

90%-iges Ethanol

abs. Alkohol

Aceton

Xylol

Meyers Hämalanlösung

1%-ige Eosinlösung

angesäuerte Ethanol/Eosinlösung:

178 ml abs. Alkohol, 2 ml Eisessig, 20 ml 1%-ige Eosinlösung

Färbung

Für die Kernfärbung werden die Schnitte 5 Minuten in Meyers Hämalaulösung (filtriert) gelegt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach Entwässern mit 70%-igem und 90%-igen Ethanol erfolgt für 5 Minuten die Plasmafärbung in der ebenfalls filtrierten angesäuerten Ethanol/Eosinlösung. Zum endgültigen Entwässern erfolgt die Behandlung mit abs. Ethanol, Aceton und Xylol. Zum Schluss erfolgt das luftfreie Eindecken mit einem Tropfen Corbitbalsam unter einem Deckglas.

3.2.3.2. Sirius Red Färbung

Prinzip

Bei dieser Färbung stellen sich Kollagenfasern rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen. Im polarisierten Licht ist das Verfahren eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Kollagen, dabei färben sich große Fibrillen gelb-orange, kleine hingegen grün.

Lösungen

Xylol

100 %-iges, 96%-iges, 80%-iges, 70%-iges Ethanol

Aqua destillata

Gesättigte wässrige Pikrinsäure

Sirius Red 0,1% : 0,1 g Sirius Red Farbstoff in 100 ml Pikrinsäure lösen, filtrieren

HCl 0,01 N

Färbung

Die Schnitte werden in Xylol entparaffiniert, dann einer absteigenden Alkoholreihe unterworfen (abs. Alkohol, 96%-iges Ethanol, 80%-iges Ethanol, 70%-iges Ethanol), mit Aqua dest. gespült, 60 Minuten mit Sirius Red gefärbt, kurz mit HCl gespült und dann mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %-iges Ethanol, 80%-iges Ethanol, 96 %-iges Ethanol, abs. Alkohol, Xylol) entwässert. Nach Abschluß dieser Vorgänge werden die Schnitte mit 1 Tropfen Corbitbalsam unter einem Deckglas luftfrei eingedeckt.

3.2.3.3. Perjodsäure-Schiff'sche Färbung [PAS]

Prinzip

Mit der Perjodsäure – Schiff's – Reaktion werden Kohlenhydratgruppen nachgewiesen. Diese werden mit Hilfe der Perjodsäure gezielt gespalten, wobei benachbarte Hydroxylgruppen zu Dialdehydgruppen oxydiert werden können. Mit Leukofuchsin (Schiff'sches Reagenz) bildet sich ein stabiler roter Farbkomplex.

Lösungen

Xylol

100 %-iges, 96%-iges, 80%-iges, 70%-iges Ethanol

Aqua destillata

0,5 %-ige Perjodsäure

Schiff'sches Reagenz (Merck)

Hämalaun nach Mayer:

a) 1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumiodat und 50 g Kaliumaluminiumsulfat werden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird blauviolett.

b) 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure werden in a) gelöst, wobei die Farbe ins Rotviolette umschlägt. Die Lösung ist sofort gebrauchsfähig und lange haltbar.

Färbung

Die Schnitte werden in Xylol entparaffiniert, dann einer absteigenden Alkoholreihe unterworfen (abs. Alkohol, 96%-iges Ethanol, 80%-iges Ethanol, 70%-iges Ethanol, Aqua bidest.), 5 min in 0,5 %-iger Perjodsäure gefärbt und 1-2 min in Aqua bidest. gespült, dann weitere 10 min in Schiff'schem Reagenz inkubiert. Spülen in Aqua bidest. und 3-5 minütige Kernfärbung mit Hämalaun, Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser und erneutes Waschen in Aqua bidest.. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %-iges Ethanol, 80%-iges Ethanol, 96 %-iges Ethanol, abs. Alkohol, Xylol) entwässert und danach mit Corbitbalsam eingedeckt.

3.2.4. Bestimmung der Interstitiellen Fibrose

Unter Nutzung der mit der Sirius-Red-Färbung hergestellten Gewebeschnitte wurde der Anteil des Bindegewebes pro Schnitt mit einem Video-Mikroskop ermittelt, was eine Aussage über das Interstitielle Bindegewebe ermöglicht.

3.2.5. Bestimmung der Media/Lumen – Ratio

Die Bestimmung der Media/Lumen-Ratio der intrarenalen Arterien wurde unter Benutzung eines Video-Mikroskops durchgeführt, das mit einem Personal Computer verbunden war. Die Daten wurden mittels des Computerprogramms Image 1.61 analysiert. Dazu mussten am PC bei allen zu findenden Arterien jeweils die äußere und innere Begrenzung der Tunica media sorgfältig mit einem Pen-Set nachgezeichnet werden, wobei die innere Begrenzung mit der Lumenbegrenzung gleichgesetzt wurde. Der Rechner wandelt die erhobenen Daten für jede Arterie in einen Quotienten um, die Media/Lumen-Ratio.

3.2.6. Bestimmung des Glomerulosklerose – Index

Die Glomerulosklerose wurde als Vorhandensein von PAS-positivem Material im Glomerulum definiert. Der Grad der Glomerulosklerose wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Scores ermittelt. Dafür wurden pro Organ jeweils 80 Glomeruli untersucht. Je nach Ausprägung der Läsionen wurde jedem Glomerulum ein Wert zwischen 0 (keine Sklerose) und 4+ zugewiesen. Dabei bedeutet 1+, dass 25% des Glomerulums PAS-positiv sind, während 100% PAS-positive Glomeruli durch 4+ repräsentiert werden. Der Score wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, wobei jeweils die Gruppenzugehörigkeit der entsprechenden Ratten nicht bekannt war.

4. Statistik

Die Unterschiede zwischen den Gruppen (bezogen auf die zu einem bestimmten Zeitpunkt erhobenen Daten) wurden einer Varianzanalyse unterzogen, die mit der Software SPSS durchgeführt wurde. Für Serienmessungen der Proteinausscheidung wurde die Varianzanalyse für wiederholte Messungen benutzt, um signifikante Veränderungen innerhalb der jeweiligen Gruppe über den Beobachtungszeitraum zu überprüfen. Beim Vorliegen globaler statistischer Signifikanz ($p < 0,05$) wurde das Vorliegen statistisch signifikanter Unterschiede zu allen Zeitpunkten innerhalb der jeweiligen Gruppe mit dem Scheffe-Test bestimmt. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche wurde für die Analyse der statistischen Unterschiede nach der Durchführung des Glomerulosklerose-Scores benutzt.