

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Narkose und Präparation

Die Versuche wurden am Musculus cremaster von Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Dieser Skelettmuskel wird aus gemeinsamen Fasern des Musculus (M.) obliquus internus abdominis und dem M. transversus abdominis gebildet³² und stellt wegen seiner geringen Schichtdicke ein geeignetes Gewebe für die Durchlichtmikroskopie dar. Es wurden Tiere im Alter von mindestens 6 Wochen mit einem Körpergewicht (KG) zwischen 90 und 335 g verwendet. Die Tierhaltung und die Versuchsdurchführungen entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Tierversuchsvorhaben waren vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin am 18.04.1995 und 05.08.1997 unter den Aktenzeichen G 0068/95 bzw. G 0093/97 genehmigt worden.

Die Versuchstiere erhielten eine intraperitoneale Injektion von 150 mg pro 100 g KG Urethan (Sigma-Aldrich, Steinheim), die innerhalb weniger Minuten zu einer deutlichen Sedierung führte. 15 Minuten nach dieser Prämedikation wurde die Narkose und Analgesie mit der Injektion von Ketamin (10 mg pro 100 g KG; Ketavet[®] 100 mg · ml⁻¹, Parke-Davis, Berlin) intramuskulär im Bereich des Oberschenkels eingeleitet. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Nachinjektionen von 30 mg pro 100 g KG Urethan bei Bedarf, im Mittel alle 90 min, aufrechterhalten. Zur Substitution der entstehenden Flüssigkeitsverluste des Tieres wurde NaCl-Lösung 0,9 % (0,7 ml · 100 g KG⁻¹ · h⁻¹) intravenös über eine Spritzenpumpe (Perfusor F, B. Braun, Melsungen) zugeführt.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe und Analgesie wurde das Versuchstier zur Präparation in Rückenlage auf einem speziellen Versuchstisch aus Plexiglas (29 x 28 cm) so positioniert, daß das Skrotum über einem mit einer dünnen runden Glasscheibe (Objektglas; Durchmesser 24 mm, Dicke 0,55 mm) versehenen Sockel lag. Später wurde über dieses Objektglas der präparierte M. cremaster zur intravitalmikroskopischen Betrachtung plan aufgespannt. Während des gesamten Versuchs wurde die Körpertemperatur des Tieres über einen Thermistorfühler (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio, USA) an der Haut gemessen und über eine thermostatgeregelte Heizmatte (Temperatur- und Regelgerät für Kleintierheizungen,

Elmedex Elektronik HB, Björklinge, Schweden) und eine Wärmelampe zwischen 36,5 und 37°C gehalten.

Nach sorgfältiger Rasur des vorderen Halsbereiches und des Unterbauches wurde die Trachea freipräpariert und nach Tracheotomie eine Kunststoffkanüle zum Offenhalten der Atemwege eingelegt. Die Spontanatmung von Raumluft war durch die Trachealkanüle während des gesamten Versuchs unbehindert möglich. Bronchialsekret wurde bei Bedarf mit einem Kunststoffkatheter endobronchial abgesaugt. Die rechte Vena jugularis interna und die linke Arteria carotis communis wurden freipräpariert und mit Polyethylen-Schläuchen katheterisiert. Über den Carotis-Katheter konnten mittels eines Druckaufnehmers (Statham P23Db, Hato Rey, Puerto Rico) mit einem Blutdruckmonitor (Servomed, Hellige, Freiburg/Breisgau) und Pulsmeter (Ratemeter Nr. 6618, Hugo Sachs Elektronik, Buchheim) der arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (Recorder 404, W+W Electronic, Scientific Instruments, Basel, Schweiz) werden.

Die Präparation des Muskels erfolgte im wesentlichen entsprechend der Technik von Baez³³ in der Modifikation von Hill und Mitarbeitern.³⁴ Die Haut über dem rechten Hoden wurde auf der Ventralseite des Skrotums durch eine Längsinzision eröffnet und der Hoden einschließlich Nebenhoden von umgebendem Bindegewebe befreit. Kleine Blutungen konnten mit einer Hochfrequenz-Koagulationsspinzette (Erbotom T 71 D, Erbe Elektromedizin, Tübingen) gestillt werden. Die Muskelfaszie wurde sorgfältig unter stereomikroskopischer Sicht mit mikrochirurgischen Instrumenten stumpf und atraumatisch vom ausgelagerten Cremastermuskel entfernt, um später eine höchstmögliche Transparenz des Muskelpräparates zu gewährleisten. Der den Hoden umschließende Cremastermuskel wurde mit einem elektrokauterisierenden Messer (Erbe-Simplex, Erbe Elektromedizin, Tübingen) auf der Ventralseite längs eröffnet, wobei die Kollateralgefäße zwischen Cremastermuskel und Epididymis bzw. Ductus deferens geschont wurden. Anschließend wurde der Muskel mit sieben Fäden (Traumafil, Polyester-S, 5/0, Catgut GmbH, Markneukirchen; Nadeln: Kalt 4 L, Thüringische Nadel GmbH, Ichtershausen) am Schnitttrand vorsichtig angeschlungen und über dem Objektglas in etwa auf die *in-situ*-Länge vor der Präparation gedehnt. Diese Stellung wurde durch Befestigung der Fäden an entsprechenden Klemmen des Versuchstisches fixiert.

Nach der Eröffnung des Skrotums wurde mit der kontinuierlichen, volumengesteuerten Superfusion des Präparationsfeldes mit pH-äquilibrierter, temperierter Tyrode-Lösung (NaCl 131,9 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgCl₂ 1,2 mM, NaHCO₃ 18,0 mM) begonnen. Die Superfusionslösung wurde mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % N₂ auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mit einem pH-Meter kontrolliert (pH-Elektrode: Dr. W. Ingold KG, Frankfurt/Main. Labor-pH-Meter: Knick, Berlin). Die Erwärmung der Superfusionslösung erfolgte mit einem Heizgerät (Haake L, Haake, Tübingen/Berlin). Die Temperatur der Lösung direkt über dem Cremasterpräparat wurde auf ungefähr 35°C eingestellt, weil diese Temperatur den Verhältnissen *in situ* entsprach, die bei mehreren Versuchstieren mit einer über eine kleine Hautinzision in das Skrotum eingeführten Thermosonde bestimmt worden war. 3 ml/min der Superfusionslösung wurden über eine Rollerpumpe mit zusätzlicher Temperiereinrichtung (Eigenbau des Institutes für Physiologie, Freie Universität Berlin, Berlin) zum Muskelpräparat transportiert. Die ununterbrochene, temperaturkonstante Flüssigkeitsbenetzung trägt zu kontrollierten, gewebeschonenden experimentellen Bedingungen bei und ermöglicht die topische Applikation von Wirksubstanzen.

Nach Beendigung der Hals- und Muskelpräparation erhielt das Tier ein Urinal aus Weichfolie (Parafilm "M", American National Can, Chicago, USA), um bei einer Miktion den Urin vom Muskelpräparat fernzuhalten. Anschließend wurde der Versuchstisch auf dem Mikroskopisch des Intravitalmikroskops montiert. Die schematische Darstellung des videomikroskopischen Versuchsaufbaues ist in Abb. 2 gezeigt. Da der gegenüber dem Gewebe höhere Sauerstoffpartialdruck der Raumluft eine Konstriktion der Arteriolen induziert hätte,^{35,36} wurde der Raum zwischen dem Mikroskopobjektiv und dem aufgespannten Cremastermuskel von einem nach oben abgeschlossenen Zelt aus Weichfolie umgeben, das am Objektivkörper befestigt war. In dieses Zelt wurde zur Verdrängung der sauerstoffhaltigen Umgebungsluft das zur Äquilibrierung der Superfusion verwendete sauerstofffreie Gasgemisch (5 % CO₂, 95 % N₂) kontinuierlich über einen Schlauch eingeleitet.

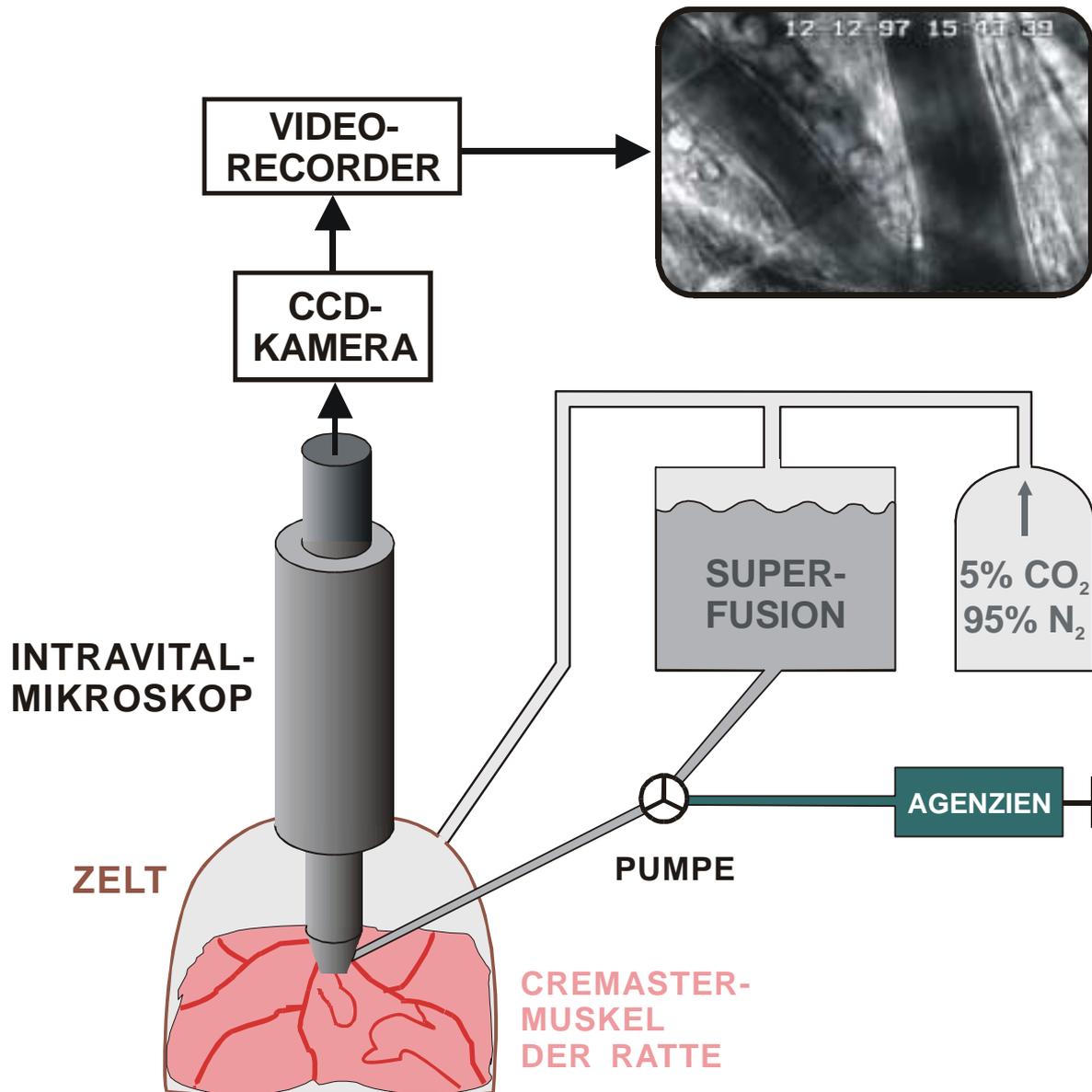


Abbildung 2:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Intravitalmikroskopie. Das Versuchstier ist nicht abgebildet. Der über einem speziellen Objektglas ausgelagerte Cremastermuskel wird von einem Zelt, in das ein Gasgemisch von 5 % CO₂ und 95 % N₂ zur Verdrängung der sauerstoffhaltigen Umgebungsluft eingeleitet wird, umhüllt und von Superfusionslösung überströmt. Der Superfusionslösung können über eine Pumpe definierte Mengen vasoaktiver Agenzien beigemischt werden. Die intravitalmikroskopischen Bilder werden über eine CCD-Kamera einem Videorecorder und einem Monitor zugeleitet.

2.2. Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie

Zur Beobachtung der Arteriolen im *M. cremaster* wurde ein modifiziertes Intravitalmikroskop (Leitz, Wetzlar) verwendet.³⁷ Die Durchlichtbeleuchtung erfolgte mit einer Halogenlampe durch das Objektglas des Versuchstisches, über das der Muskel aufgespannt war. Die Beleuchtungsintensität wurde über Blaufilter (Schott, Mainz) reduziert, um den Muskel vor zu hoher Lichtenergie zu schützen und den Kontrast der Gefäßwände zur Umgebung zu erhöhen. Zur zusätzlichen Schonung des Muskelpräparates wurde die Beleuchtung in den Versuchspausen abgeschaltet. Als Immersionsflüssigkeit für das Objektiv (25/0,60 SW, Leitz, Wetzlar) diente die Tyrode-Superfusionsflüssigkeit, die das Präparat von einer seitlich am Objektivkörper befestigten Düse überströmte. Das mikroskopische Bild konnte sowohl direkt beobachtet als auch über ein Projektionsokular einer Videokette zugeleitet werden. Diese umfaßte eine CCD-Kamera (JAI M50, Stemmer Imaging GmbH, Puchheim), einen Videomonitor (PVM-122CE, Sony, Japan) und einen S-VHS-Videorecorder (AG-5700, Panasonic, Japan) mit einblendbarem Video-Timer (VTG33, FOR-A Company, Japan).

2.3. Versuchsablauf

Nach Beendigung der Muskelpräparation und der Umlagerung des Versuchstieres unter das Intravitalmikroskop wurde zur Stabilisierung der systemischen und lokalen Hämodynamik 30 Minuten bis zum eigentlichen Versuchbeginn abgewartet. In dieser Zeit wurde im Muskelpräparat ein arteriolarer Gefäßbaum mit Gefäßdurchmessern unter 140 μm aufgesucht und sein Verlauf zur Orientierung auf Papier skizziert. Zum wiederholten Auffinden von Gefäßstellen dienten einerseits der Gefäßverlauf und markante Gewebestrukturen in der Umgebung sowie andererseits die zweidimensionalen Koordinaten, die mit der digitalen X/Y-Positionskontrolle des Mikroskoptisches (CPA621A07, Elesta Elektrotechnik AG, Schweiz) bestimmt wurden. Die Beobachtungsstellen für Durchmessermessungen wurden an ausgewählten Verzweigungsstellen festgelegt. Dabei lagen die Beobachtungsstellen jeweils 150 μm vom Bifurkationsmittelpunkt entfernt (Abb. 3).

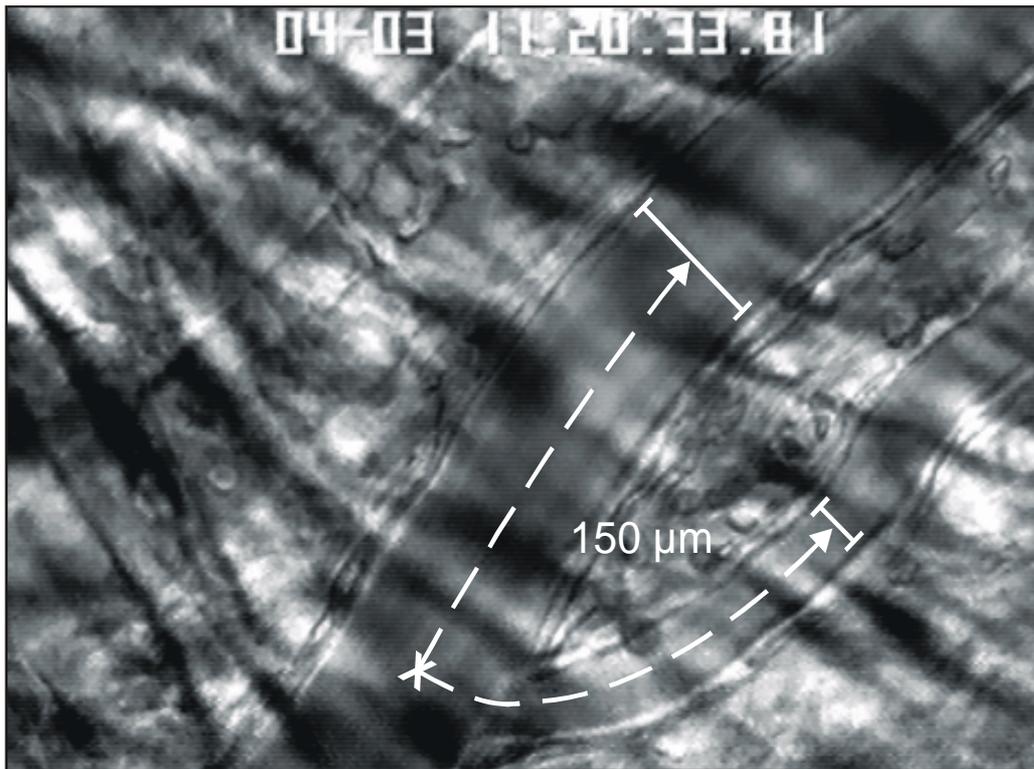


Abbildung 3:

Intravitalmikroskopische Aufnahme einer arteriolären Bifurkation aus dem M. cremaster der Ratte. Vom zuführenden Muttergefäß ist nur ein kurzes Stück abgebildet. Die gekennzeichneten Meßstellen im stromabwärts gelegenen großen bzw. kleinen Tochtergefäß sind jeweils 150 μm vom Bifurkationsmittelpunkt (mit 'X' markiert) entfernt.

Nach der Videoaufzeichnung aller Beobachtungsstellen im Kontrollzustand erfolgte in einer für die einzelnen Versuchsserien festgelegten Reihenfolge die pharmakologische Beeinflussung der Autakoid-Stoffwechselwege mit den entsprechenden Agenzien. Die Effekte von EDHF wurden mit Charybdotoxin (ChTX; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), einem spezifischen Inhibitor von K^+_{Ca} -Kanälen, unterdrückt.³⁸⁻⁴¹ Auf Grund der hohen Kosten von ChTX wurden außerdem Versuchsserien mit den nichtselektiven K^+ -Kanal-Hemmern Tetrabutylammonium^{25,42,43} (TBA; Sigma) bzw. Tetraethylammonium¹⁹ (TEA; Sigma) durchgeführt. Der alternative EDHF-Stoffwechselweg via K^+_{IR} -Kanäle und Na^+/K^+ ATPase wurde entsprechend der Arbeit von Edwards und Mitarbeitern³¹ mit Barium (Ba^{2+} ; Sigma) und Ouabain (Sigma) blockiert. Die Produktion von NO und PG wurde spezifisch mit N^{G} -Nitro-L-Arginin (L-NNA; Sigma) bzw. Indometacin

(INDO; Sigma) gehemmt. Als Vasodilatoren wurden Acetylcholin (ACh; Sigma), Adenosin (ADO; Serva Feinchemica, Heidelberg), Papaverin (PAP; Sigma) und Nitroprussid-Natrium (SNP; Sigma) benutzt.

Alle Substanzen wurden einzeln oder kombiniert über eine Spritzenpumpe (Harvard Infusion Pump, Harvard Apparatus Limited, Edenbridge, U.K.) der Superfusionslösung zugemischt, kurz bevor sie das Muskelpräparat überströmte. Das Verdünnungsverhältnis der jeweiligen Agenzien durch die Tyrode-Lösung betrug hierbei 1 : 100. Die Konzentrationsangaben beziehen sich im folgenden immer auf die resultierende Endkonzentration der Substanzen in der Superfusionslösung am Präparat. Da die für eine kontinuierliche Beimischung zur Superfusionslösung benötigten Mengen von ChTX nicht verfügbar waren, wurde bei gestoppter Superfusion das in der Endkonzentration in gewärmter Tyrode-Lösung vorbereitete ChTX aus einer 1 ml-Spritze in den Raum zwischen Mikroskopobjektiv und Muskelpräparat gefüllt, so daß zwischen beiden ein durch die Oberflächenspannung stabilisierter Flüssigkeitskegel entstand. Zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten bzw. zur Erneuerung der Wirkkonzentration von ChTX wurde eine Gesamtmenge von 1 ml über 30 min manuell aus der Spritze nachgegeben.

Nach den jeweiligen Applikationszeiten der Agenzien wurden unter fortlaufender Substanzgabe die ausgewählten Beobachtungsstellen für die arterioläre Durchmesser messung auf Videoband aufgezeichnet. Die Zeitabläufe und Konzentrationen der verwendeten Agenzien für die einzelnen Versuchsreihen werden im Folgenden in Tabellen erläutert. In allen Versuchsreihen erfolgte zuerst eine dreiminütige Superfusion von ACh 10 μM . Am Versuchsende wurden, außer in *Versuchsreihe C*, der endothelabhängige Vasodilatator ACh und die endothelunabhängigen Vasodilatoren PAP 200 μM , ADO 100 μM und SNP 10 μM in Kombination über fünf Minuten appliziert, um eine maximale Gefäßdilatation auszulösen.

2.3.1. Versuchsreihe A: Blockade der K^+_{Ca} -Kanäle mit ChTX

Nach der Gabe von ACh wurde die kontinuierliche Superfusion gestoppt und ChTX 3 μM nach der oben beschriebenen Technik über 30 min appliziert. Hierbei wurde die Applikationsdauer im Vergleich zu den übrigen eingesetzten Blockern von 20 auf 30 Minuten erhöht, um der geringe-

ren Diffusionsgeschwindigkeit von ChTX Rechnung zu tragen. Anschließend wurde die Superfusionslösung wieder gestartet, der PAP, ADO und SNP beigemischt wurden.

Tabelle 1: Blockade der K^+_{Ca} -Kanäle mit ChTX

<i>Versuchsreihe</i>	Applikationsdauer (min)		
A	3	30	5
ACh			
ChTX			
PAP + ADO + SNP			

2.3.2. Versuchsreihe B: Dosis-Wirkungsexperimente von TBA und TEA

In Dosis-Wirkungsexperimenten mit TBA (*Versuchsreihe B1*) bzw. TEA (*Versuchsreihe B2*) wurden schrittweise gesteigerte Konzentrationen (TBA 0,03 / 0,1 / 0,3 / 1 mM bzw. TEA 0,3 / 1 / 3 / 10 mM) appliziert. Die Superfusionszeit betrug für jede Konzentrationsstufe 20 min. Die einzelnen TBA- bzw. TEA-Lösungen wurden am Ende jeder Konzentrationsstufe kombiniert mit ACh für jeweils drei Minuten appliziert.

Tabelle 2: Konzentrationsexperimente für TBA und TEA (Konzentrationen in mM)

<i>Versuchsreihe</i>		Applikationsdauer (min)									
<i>B1</i>	<i>B2</i>	3	20	3	20	3	20	3	20	3	5
ACh											
TBA 0,03	TEA 0,3										
TBA 0,1	TEA 1										
TBA 0,3	TEA 3										
TBA 1	TEA 10										
PAP + ADO + SNP											

Entsprechend der Ergebnisse der Dosis-Wirkungsexperimente wurde im Folgenden TBA in der Konzentration 0,1 mM verwendet.

2.3.3. Versuchsreihe C: Funktionelle Endotheldenudierung

Das Endothel von Arteriolen wurde mit der sogenannten Light-Dye-Technik funktionell zerstört.^{44,45} Nach der Applikation eines intravenösen Bolus von 0,1 ml/100g KG einer 3 %igen Fluoresceinlösung wurde die durch kontinuierliche ACh-Superfusion dilatierte Arteriole bestrahlt. Das mit einer Xenon-Bogenlampe (150 W; Leitz, Wetzlar) und dem Filterblock I2 (Bandpaßfilter 450-490 nm) des Fluoreszenz-Auflichtilluminators (Ploemopak[®], Leitz, Wetzlar) erzeugte blaue Auflicht wurde auf eine ca. 150 µm lange Gefäßstelle für 90 bis 120 Sekunden eingeblendet. Die funktionelle Endotheldenudierung wurde durch den Übergang von einer endothelvermittelten Vasodilatation in eine Vasokonstriktion durch die direkte Acetylcholin-Wirkung am glatten Gefäßmuskel festgestellt. Als Kriterium für den Verlust der Endothelfunktion nach der Light-Dye-Applikation wurde eine Durchmesserabnahme von mehr als 5 % unter ACh-Gabe gegenüber der unbehandelten Kontrolle definiert. Außerdem wurden nur die Gefäße ausgewertet, die am Ende des Versuchs unter Gabe der endothelunabhängigen Vasodilatoren PAP, ADO und SNP dilatierten. Nach der Denudierung wurde eine Pause von 30 min eingehalten, damit sich stabile hämodynamische Verhältnisse einstellen konnten.

Nach einer weiteren funktionellen Kontrolle durch Superfusion von ACh für drei Minuten wurden L-NNA 30 µM und INDO 10 µM kontinuierlich appliziert, um jegliche Effekte durch NO und PG, die eventuell aus den intakten Endothelbezirken mit dem Blutstrom in den denudierten Gefäßabschnitt gelangt sein könnten, auszuschließen. Anschließend wurde zu L-NNA und INDO zusätzlich TBA (0,1 mM) über 20 min appliziert. Da ACh an einem funktionell denudierten Gefäß eine Vasokonstriktion induziert, wurde zur Auslösung einer maximalen Vasodilatation auf ACh in der Kombination mit PAP, ADO und SNP verzichtet.

Tabelle 3: Funktionelle Endotheldenuidierung und Blockerapplikation

Versuchsreihe	Applikationsdauer (min)							
	3	Z	30	3	20	20	5	
C								
ACh								
Fluorescein 3 %								
L-NNA + INDO								
TBA								
PAP + ADO + SNP								

Z: Zeitdauer der Auflichtapplikation zur funktionellen Endotheldenuidierung
(zwischen 90 und 120 s)

2.3.4. Versuchsreihe D: Kumulative Blockade zweier Autakoid-Systeme

Zur Blockade von NO oder PG wurde L-NNA 30 µM bzw. INDO 10 µM über 20 min appliziert. Anschließend wurden zwei Autakoid-Systeme in unterschiedlicher Reihenfolge blockiert, so daß L-NNA plus TBA 0,1 mM (Versuchsreihe D1), INDO plus TBA (D2), L-NNA plus INDO (D3) und INDO plus L-NNA (D4) appliziert wurden. Zur Untersuchung der ACh-induzierten Vasodilatation wurden zusätzlich jeweils die entsprechenden Blocker gemeinsam mit ACh über drei Minuten superfundiert.

Tabelle 4: Kumulative Applikation von zwei blockierenden Substanzen

Versuchsreihe				Applikationsdauer (min)					
D1	D2	D3	D4	3	20	3	20	3	5
ACh									
L-NNA	INDO	L-NNA	INDO						
TBA	TBA	INDO	L-NNA						
PAP + ADO + SNP									

2.3.5. Versuchsreihe E: Kombinierte Blockade von NO, PG und EDHF/K_{Ca}⁺-Kanäle

Die Blockade der Wirkungen von NO, PG und EDHF/K_{Ca}⁺-Kanäle wurde durch kombinierte Superfusion von L-NNA 30 µM, INDO 10 µM und ChTX 3 µM über 30 min bzw. TBA 0,1 mM über 20 min erreicht. Die Blockerkombination mit ChTX wurde in den Endkonzentrationen in einer Spritze aufgezogen und bei ausgesetzter Superfusion nach der oben beschriebenen Technik appliziert.

Tabelle 5: Kombinierte Applikation von L-NNA, INDO und ChTX bzw. TBA

Versuchsreihe		Applikationsdauer (min)				
<i>E1</i>	<i>E2</i>	3	ChTX: 30 / TBA: 20	3	5	
ACh						
L-NNA						
INDO						
ChTX	TBA					
PAP + ADO + SNP						

2.3.6. Versuchsreihe F: Blockade des alternativen EDHF-Stoffwechselwegs

Ba²⁺ 30 µM und Ouabain 1 mM wurden unter fortlaufender Gabe von L-NNA 30 µM und INDO 10 µM über 20 min appliziert.

Tabelle 6: Blockade der K_{IR}⁺-Kanäle und Na⁺/K⁺-ATPase bei gehemmter NO- und PG-Synthese

Versuchsreihe		Applikationsdauer (min)				
<i>F</i>		3	20	3	20	3 5
ACh						
L-NNA + INDO						
Ba ²⁺ + Ouabain						
PAP + ADO + SNP						

2.4. Versuchsauswertung

Nach Abschluß des Experimentes erfolgte die Versuchsauswertung anhand der Videoaufzeichnungen mittels eines computergestützten Bildanalyse-Systems.⁴⁶ Eine mit einem S-VHS-Videorecorder (SVO-9500MDP, Sony, Japan) und Videomonitor (PVM-146E, Sony, Japan) verbundenen Videobild-Prozessorkarte (FG 100 AT, Imaging Technology Inc., Woburn, USA) in einem Personal-Computer digitalisierte das Videobild mit einer Auflösung von 512 x 512 Bildelementpunkten (Pixel) und legte diese Informationen im Bildspeicher ab. Eine in das Bild einblendbare und in Lage und Länge interaktiv steuerbare Cursorlinie diente nach entsprechender Kalibrierung den Durchmesser- und Distanzmessungen im Gefäßbaum.

Eine exakte und reproduzierbare Durchmesserbestimmung war anhand des inneren Durchmessers möglich, da die Endothelzellschicht gegen das Gefäßlumen unter allen Versuchsbedingungen visuell gut abgrenzbar war. Hierzu wurde eine Cursorlinie senkrecht zur Gefäßlängsachse zwischen die Endothelzelloberflächen der beiden gegenüberliegenden Gefäßwände definiert (Abb. 4).

Als Parameter für den Tonus der Arteriolen *in vivo* wurde das Verhältnis zwischen dem aktuellen Durchmesser (D) und dem Maximaldurchmesser (D_{Max}) nach der Formel³⁶

$$\text{Tonus (\%)} = \frac{D_{Max} - D}{D_{Max}} \cdot 100$$

bestimmt. Der hierbei zugrunde gelegte Wert für D_{Max} entsprach dem größten im Versuchsverlauf aufgetretenen Gefäßdurchmesser.

Die Wirkungen der Blocker (L-NNA, INDO, ChTX, TBA oder TEA) wurden als prozentuale Änderung des Gefäßdurchmessers, berechnet aus dem Durchmesser ohne pharmakologische Beeinflussung (D_{Kontr}) und dem Durchmesser nach Autakoid-Blockade (D_{Block}), quantifiziert.

$$\text{Durchmesseränderung (\% der Kontrolle)} = \frac{D_{Block} - D_{Kontr}}{D_{Kontr}} \cdot 100$$

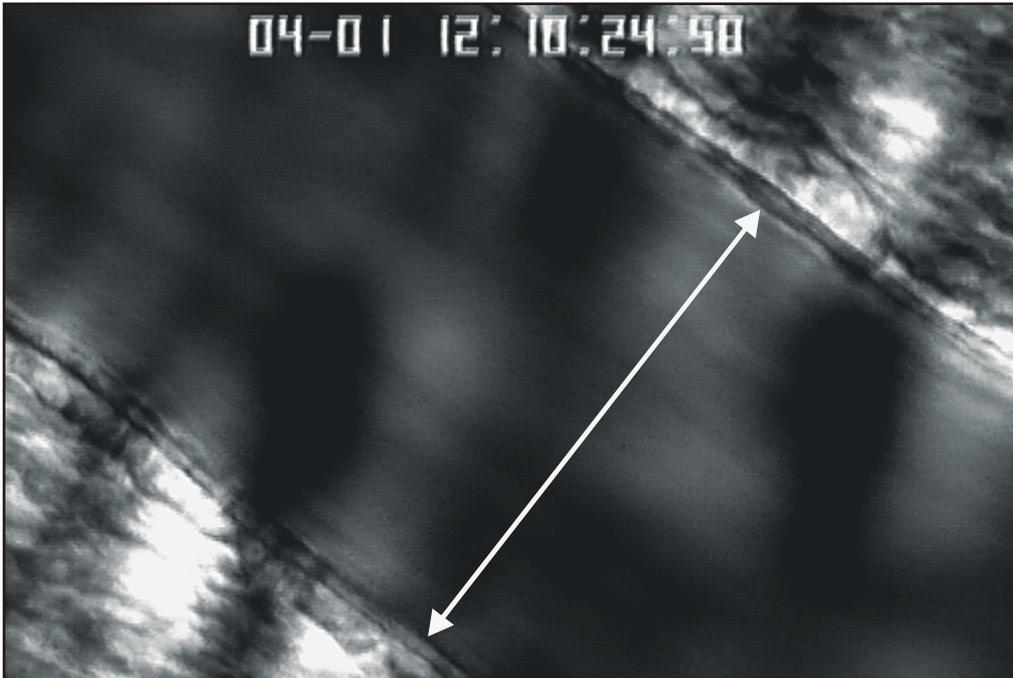


Abbildung 4:

Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Arteriole aus dem Cremastermuskel der Ratte. Zur Messung des inneren Gefäßdurchmessers wird mit einem computerisierten Auswerteprogramm eine Cursorlinie senkrecht zur Gefäßlängsachse zwischen die Endothelzellschichten der beiden gegenüberliegenden Gefäßwände positioniert und die Distanz (hier 78,6 μm) anhand der durchgeführten Kalibrierung bestimmt.

Aus den Durchmesseränderungen nach Autakoid-Blockade wurde die resultierende Änderung des Strömungswiderstandes der Arteriolen bezogen auf den Strömungswiderstand des pharmakologisch unbehandelten Gefäßes nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille berechnet.

$$\text{Arteriöler Widerstand (relativ zur Kontrolle)} = \left(\frac{1}{1 + \frac{D_{\text{Block}} - D_{\text{Kontr}}}{D_{\text{Kontr}}}} \right)^4$$

Die Dilatationen der Arteriolen nach Applikation von ACh wurden relativ zur Dilatationsreserve ($D_{\text{Max}} - D_{\text{Kontr}}$) der einzelnen Gefäße angegeben,¹⁷ um die dilatatorischen Antworten unabhängig vom bestehenden Gefäßtonus vergleichen zu können.

$$\text{ACh - Dilatation (\% der Dilatationsreserve)} = \frac{D_{\text{ACh}} - D_{\text{Kontr}}}{D_{\text{Max}} - D_{\text{Kontr}}} \cdot 100$$

In die Auswertung wurden nur Gefäße aufgenommen, die auf die erste ACh-Applikation, die direkt dem unbehandelten Zustand folgte, nicht mit einer signifikanten Durchmesserabnahme ($\geq 10\%$ der Kontrolle) reagierten, da dies eine geschädigte Endothelfunktion anzeigen könnte. Durch die Anwendung dieses Kriteriums wurden rund 3 % der Arteriolen ausgeschlossen. Als zweites Kriterium mußte erfüllt sein, daß der am Versuchsende unter der kombinierten Applikation der vier vasodilatatorischen Substanzen (ACh, PAP, ADO und SNP) erreichte Durchmesser mehr als 90 % des maximalen im Versuchsverlauf bestimmten Durchmessers betrug. Ungefähr 10 % aller Gefäße, deren abgeschwächte Dilatation eine Gewebeschädigung während des Versuchs wahrscheinlich machte, wurden ausgeschlossen.

2.5. Statistik

Die statistischen Analysen des Datenmaterials wurden mit dem Computerprogramm SPSS für Windows 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. "n" entspricht der Anzahl der untersuchten Arteriolenabschnitte. Die Mittelwerte (MW) sind zusammen mit der Standardabweichung (SD) oder, wenn die Genauigkeit des errechneten Mittelwertes von Interesse war, dem Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Charakterisierung von Meßreihen mit stark nichtsymmetrischer Verteilung ist der Median mit zugehörigem Standardfehler (SE) aufgeführt.

Zur Untersuchung funktionaler Beziehungen zwischen dem Gefäßtonus und anderen Parametern wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die stark asymmetrisch verteilten Daten für den Tonus wurden logarithmisch (log) transformiert, um näherungsweise eine Normalverteilung der Daten zu erreichen und lineare Regressionen berechnen zu können. Als Maßzahl für die Stärke

eines linearen Zusammenhangs wurden der Korrelationskoeffizient r bzw. das Bestimmtheitsmaß r^2 angegeben und durch den t-Test auf Signifikanz geprüft. Wenn auch durch eine Logarithmustransformation eine annähernde Normalverteilung der erhobenen Daten nicht erreicht werden konnte, wurde die verteilungsunabhängige Rangkorrelation mit dem Abhängigkeitsmaß r_s (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman) berechnet.

Statistische Unterschiede zwischen einzelnen Datengruppen, z.B. für Gefäßdurchmesser vor und nach pharmakologischer Beeinflussung, wurden durch die Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender post-hoc Korrektur für Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Test) auf Signifikanz geprüft. Als verteilungsunabhängiges Testverfahren wurde der Median-Test verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden Unterschiede als signifikant gewertet.