

2 Methoden

2.1 Präparation

Die Untersuchungen wurden *in vitro* an isolierten Segmenten des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra bzw. der Arteria coronaria dextra des Menschen durchgeführt. Dazu wurden Koronararterien von explantierten Herzen von Patienten verwendet, die sich im Deutschen Herzzentrum Berlin einer Herztransplantation unterzogen.

2.1.1 Explantation

Die Gefäße wurden sofort nach Explantation des Empfängerherzens im Rahmen einer Herztransplantation entnommen. Dabei wurde auf die Nähe des Präparats zur Aorta ascendens geachtet sowie auf die vollständige Intaktheit aller Wandschichten nach Entnahme. Während der gesamten Entnahmezeit wurden die Präparate mit gekühlter isotoner NaCl-Lösung feucht gehalten. Der Transport ins Labor geschah sofort nach Entnahme in gekühlter Krebs-Lösung.

2.1.2 Feinpräparation und Äquilibration

Die Präparation geschah in erwärmter, oxygenierter Krebs-Lösung. Die Präparate wurden in 0,5 cm breite Segmente geschnitten und anschließend, nach der Entfernung des adventitiellen Bindegewebes, in longitudinaler Richtung aufgeschnitten. Dabei entstanden Präparate von 5 mm Länge und ca. 10-15 mm Breite, deren Gefäßmuskelzellen in etwa parallel zu den Längsseiten verliefen. Die Gefäßstreifen wurden vermittels einer Inspektion insbesondere der Gefäßintima in normale und arteriosklerotische Präparate unterteilt. Anschließend wurden die Präparate mindestens zwei Stunden in carbogenisierter Krebs-Lösung (37°C, pH 7,4, 95% O₂, 5% CO₂) äquilibriert, wodurch insbesondere die ursprünglichen Na⁺- und K⁺-Gradienten wiederhergestellt wurden. Für die Versuche mit deendothelialisierten Präparaten wurde das Endothel der Gefäßstreifen vorsichtig mit einem im 30°-Winkel aufgesetzten Skalpell abgeschabt. Der Erfolg dieser Maßnahme wurde lichtmikroskopisch bestätigt.

2.1.3 Lösungen und Substanzen

Als Spül- und Badlösung diente modifizierte Krebs-Lösung folgender Zusammensetzung (Konzentrationen in mmol/l): Na⁺ 151,19, K⁺ 4,69, Ca²⁺ 2,52, Mg²⁺ 1,10, Cl⁻ 143,42, HCO₃⁻ 16,31, H₂PO₄⁻ 1,38 und Glucose 7,77. Auf einen Zusatz organischer Puffer konnte verzichtet

werden, da die Krebs-Lösung ständig mit einem Carbogen-Gemisch (95% O₂, 5% CO₂) begast wurde; die Effektivität der Begasung wurde durch eine kontinuierliche Kontrolle des pH-Werts während der Versuchsvorbereitung und in der Meßkammer gewährleistet.

Zur Abspaltung der Ektodomäne der Syndecan-Moleküle von der luminalen Endothelzellmembran sowie zur Zerstörung der Integrität der Matrixbestandteile diente Trypsin in einer Konzentration von 0,05% (Gibco BRL). Die dafür vorgesehenen Präparate wurden nach der Präparation für eine Dauer von 1 min in der Trypsin-Lösung (37°C, pH 7,4, 95% O₂, 5% CO₂) schüttelnd inkubiert, anschließend 1 min in einem separaten Gefäß mit gewärmter Krebslösung gespült und abschließend eine Stunde in carbogenisierter, gewärmter Krebs-Lösung äquilibriert. Durch den Spülvorgang wurde gewährleistet, daß nach Ablauf der Inkubation keine Restaktivität des Enzyms mehr vorhanden war.

Die Intaktheit des Endothels nach Inkubation mit Trypsin wurde mittels lichtmikroskopischer Untersuchung trypsinisierter Gefäßabschnitte nach HE-Färbung überprüft (s. Abb. 1 und 2).

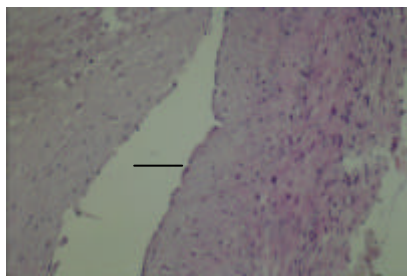


Abb. 1

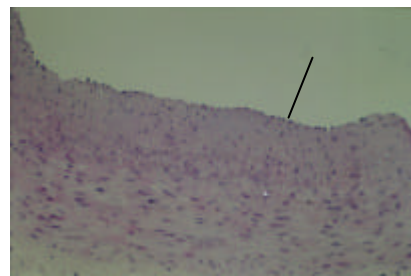


Abb.2

Abb. 1 und 2: HE-Färbung eines unbehandelten (Abb. 1) und eines trypsinisierten (Abb. 2) normalen koronaren Gefäßpräparats in 40-facher Vergrößerung. Auf beiden Schnitten ist der typische arterielle Wandaufbau mit Endothel (—), Media und bindegewebiger Adventitia zu sehen.

Nach Trypsinisierung der Präparate wurden die Konzentrationen von Syndecan-1 (mittels ELISA, Diaclone Inc., Frankreich) und Syndecan-4 (mittels Sandwich-ELISA unter Verwendung von polyklonalen Kaninchen-anti-Syndecan-4-Antikörpern, Zymed Lab. Inc., USA, und monoklonalen Maus-anti-Syndecan-4-Antikörpern, Santa Cruz Technology, USA) im Überstand der Trypsinlösung gemessen (Methode nach Rioux) [139]. Die Konzentration beider Syndecane betrug 150-250 ng/ g Feuchtwicht. Dies beweist die erfolgreiche Abtrennung der Syndecan-Moleküle aus der Gefäßwand durch die von uns vorgenommene Trypsinisierung.

2.2 Messung der Flußrate

Über einen Wärmetauscherkreislauf wurden die Lösungen aus den Vorratsbehältern direkt zu der Meßkammer geleitet. Durch ein Schraubventil direkt vor der Kammer konnte die Flußmenge stufenweise verstellt werden. Die Kontrolle der Flußmenge und –geschwindigkeit erfolgte per Hand mit Meßzylindern und Stoppuhr nach jeder Veränderung des Flußes. Die jeweilige Flußrate wurde protokolliert.

2.3 Messung der Kraftentwicklung

Die Gefäßstreifen wurden mit der Endothelseite nach oben an den Schmalseiten mit zwei Plexiglas-Schraubklemmen in der Meßkammer fixiert. Eine Seite war über die Schraubklemme direkt mit der Meßkammer, die andere mit dem Kern eines induktiven Kraftaufnehmers verbunden. Der Meßweg des Kraftaufnehmers betrug weniger als 100 µm, so daß die Messung bei einer maximal möglichen Verkürzung des Präparats um etwa 1% der Gesamtlänge nahezu isometrisch erfolgte. Die Kraftentwicklung wurde über einen digitalen Messverstärker (KWS 522.C;CMS 32, KS2C, Hottinger Baldwin, Darmstadt) angezeigt und via RS 232C ausgegeben. Vor den Versuchen wurde die Kraftmeßvorrichtung mit Gewichten von 1g bis 10g über eine Umlenkrolle geeicht.

Jedem Versuch ging die Vorspannung der Präparate mit einer Kraft von 2 cN (entsprechend 2,04 g) über 15 min voraus.

Die Temperatur der Lösung wurde mit einem Haake-Thermostaten auf 37,0 °C reguliert und konstant gehalten. Der pH-Wert wurde auf Werte zwischen 7,35 und 7,40 eingestellt.

2.4 Messung des Membranpotentials

2.4.1 Mikroelektroden

Das Spezialelektroden Glas (Pyrex Brand K2916, Corning Glass Works, New York; Innen-/ Außendurchmesser: 1,8/3,0 mm) wurde mit einem Horizontal-Puller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) bei 6,8 A Heizstrom (Spannungsregler: Standard Electronic Productions, New York) in 2 min ausgezogen. Die entstandenen Elektroden wurden durch Druckerniedrigung mit einer Vakuumpumpe (D6, Leybold-Heraeus, Hanau) in 99,9-prozentigem Ethylalkohol gekocht und anschließend zum Austausch der Füllung zuerst 48 Stunden in Aqua bidest., dann mindestens 24 Stunden in 3-molarer KCl-Lösung gelagert.

Die Elektroden wurden direkt nach Herstellung lichtmikroskopisch auf Größe und Durchgängigkeit der Spitzenöffnung kontrolliert, wobei alle Elektroden mit einem Spitzendurchmesser > 400 nm ausgesondert wurden. Die so entstandenen Elektroden konnten die glatten Gefäßmuskelzellen (mit einer Breite von $2-5 \mu\text{m}$ und einer Länge von $30-110 \mu\text{m}$) nicht verletzen und waren in der Lage, mit stehenden Einstichen das intrazelluläre Potential aufzunehmen. Die Tip-Potentiale wurden auch während der Versuchsdurchführung gemessen und betrugen zwischen -50 mV und -120 mV.

Als indifferente Elektrode diente eine Agar-Brücke, die mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllt war. Sie verband die Meßkammer mit einem Gefäß mit 3-molarer KCl-Lösung, das durch eine Ag/AgCl/Platin-Elektrode mit dem Meßverstärker verbunden war.

2.4.2 Meßverstärker und Datenaufnahme

Zur Abschirmung des gesamten Versuchstandes diente ein großer Faraday-Käfig. Zusätzlich waren die Glaskapillar-Mikroelektroden wie auch die Verbindungen zum Differenzverstärker mit zwei Potentialfolgern (Difference Voltage Follower/ IV Converter Typ D 6903, H, Ehrler & Peper, Neckargemünd) abgeschirmt.

Das zehnfach verstärkte Ausgangssignal des Verstärkers steuerte ein Großbildoszilloskop (SGM 43 BN s/N 293, Knott, München), das neben dem Spannungssignal auch die Kraftentwicklung anzeigte, ein Vierstrahloszilloskop (Typ 565, Tektronix, Beaverton, USA), das neben den beiden genannten Signalen auch eine Zeiteichung abbildete, sowie einen AD-DA-Wandler (DT2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA), der die drei Signale in einen PC (80486 DX2-66, 8 MB, Highscreen, Vobis, Aachen) übertrug, mit dessen Hilfe sie unter WinADDA 1.31 (mikrotaurus Software, Berlin) in Echtzeit dargestellt und aufgezeichnet werden konnten.

2.4.3 Einstiche

Die Meßelektroden wurden unter Sichtkontrolle mittels eines Mikromanipulators (s20-21R, Leitz, Wetzlar) senkrecht an die luminale Seite des Gefäßes herangeführt. Der Einstich erfolgte durch Klopfen an den Antivibrationstisch, so daß die Elektrodenspitze Endothel und Basalmembran durchstechen konnte.

Die Differenzierung echter Einstiche in die Gefäßmuskulatur von Verbiegungsartefakten geschah nach mehreren Kriterien:

- der Potentialsprung auf den Endwert mußte sofort nach dem Durchdringen der Basalmembran erfolgen,

- Ein- und Ausstich sollten gleich schnell erfolgen,
- das Elektroden-Hintergrundsrauschen durfte sich während der Prozedur nicht ändern,
- die Tip-Potentiale vor und nach Einstich durften sich nicht unterscheiden,
- das Potential musste sich, wenn möglich deutlich, vom Endothelzellpotential von -20 bis -40 mV unterscheiden.

An jedem Gefäßstreifen wurden bei jedem Flußwert mindestens 10, in Einzelfällen bis zu 40 Einstiche durchgeführt. Dazwischen wurde die Position der Elektrode in kleinen Schritten verändert, um einen möglichst repräsentativen Wert für das Gesamtpräparat zu erhalten. Bei der Auswertung wurden nur die Potentialmessungen berücksichtigt, die den oben genannten Kriterien genügten. Im Einzelfall gelang die kontinuierliche Messung des Membranpotentials an einer Zelle über den gesamten Versuchsverlauf mittels eines einzigen, stehenden Einstichs. Da kontinuierlich sowohl die Kraftentwicklung als auch die Membranpotentiale gemessen wurden, darf angenommen werden, daß die Potentialmessung an Zellen erfolgte, die auch zur Kraftentwicklung beitrugen.

2.5 Versuchsdurchführung

Nach dem Ein- und Vorspannen der Präparate in Krebs-Lösung bei einem Fluß von 3 ml/min erfolgte nach 10 Minuten die erste Messung von Tonus und Membranpotential. Anschließend wurde in 10-minütigen Abständen die Flußrate auf 5 ml/min, 20 ml/min, 40 ml/min und 100 ml/min erhöht, so daß die Präparate jeweils 10 min einer Flußrate ausgesetzt waren. Da die Kraftentwicklung der Präparate nach etwa 10 min in einen „steady state“ übergegangen war, konnten die Membranpotential-Messungen jeweils direkt vor Erhöhung der Flußrate unter mechanisch quasi-stationären Bedingungen vorgenommen werden.

2.6 Korrektur der „stress relaxation“

Alle Gefäßpräparate zeigen unter Dauerbelastung eine von der Flußrate unabhängige leichte Dilatation, die „stress relaxation“. Um die flußabhängige Relaxation der Gefäßstreifen voneinander um einiges geringeren stress relaxation differenzieren zu können, wurde an Vergleichspräparaten für die jeweilige komplette Versuchsdauer die stress relaxation aufgezeichnet. Die gemessene flußabhängige Dilatation wurde um die Differenz zu dem unter konstanten Flußbedingungen zum gleichen Zeitpunkt gemessenen Wert korrigiert. Die unter „Ergebnisse“ wiedergegebenen Werte sind alle bereits in dieser Weise korrigiert.

2.7 Auswertung

2.7.1 Auswertungsmodell

Zur Ermittlung der relativen Anteile von Endothel bzw. Matrix an der Nettokraftentwicklung wurde ein mathematisches Modell entwickelt. In einem ersten Schritt wurden die zu vergleichenden Meßreihen auf einen identischen Ausgangswert normiert, um trotz unterschiedlicher Basaltonus eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Nettokraftentwicklung zu gewährleisten. Die Nettokraftentwicklung beim Fluß x , $T(x)$, wurde gemäss Gleichung 3 berechnet, entsprechend

$$\text{(Gleichung 3)} \quad \mathbf{T(x)} = \mathbf{t(x)} - \mathbf{t(basal)}$$

mit $t(x)$ = Meßwert des Präparats bei Fluß x und $t(\text{basal})$ = Basaltonus des Präparats.

Der Gesamteffekt von Endothel (E) und Matrix (M) bei Fluß x , $T_{EM}(x)$ wurde aus der normierten Differenz der Meßwerte von endothelhaltigen trypsinisierten und unbehandelten Präparaten ermittelt und mit der normierten Differenz der Meßwerte der unbehandelten Präparate gemittelt.

Der Effekt der Matrix bei Fluß x , $T_M(x)$, wurde aus der normierten Differenz der Meßwerte von deendothelialisierten trypsinisierten und deendothelialisierten Normalpräparaten ermittelt und mit der normierten Differenz der Meßwerte von endothelhaltigen und deendothelialisierten Normalpräparaten gemittelt.

Der Effekt des Endothels bei Fluß x , $T_E(x)$, wurde als Differenz aus Gesamteffekt $T_{EM}(x)$ und Matrixeffekt $T_M(x)$ berechnet.

Um den Anteil von $T_E(x)$ und $T_M(x)$ an der maximalen flußabhängigen Dilatation zu ermitteln, wurden $T_E(x)$ und $T_M(x)$ bei jeder Flußrate als Proportion von 0,461 g berechnet (entsprechend der Nettodilatation von $0,461 \pm 0,091$ g, die in normalen, unbehandelten Präparaten unter der maximalen Flußgeschwindigkeit von 100 ml/min auftritt).

Alle drei Rechenverfahren wurden jeweils für normale und arteriosklerotische Präparate angewandt.

2.7.2 Statistische Methoden

Die Meßwerte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Es wurde für jede Flußrate jeweils das arithmetische Mittel der Meßwerte der Einzelversuche gebildet. Bei den Potentialwerten wurde auf die Angabe der Anzahl der Einzeleinstitute verzichtet. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der t -Test nach Student für unverbundene Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten herangezogen. Zusätzlich wurde eine Analyse der Varianz sämtlicher Meßreihen (n-way anova) durchgeführt.