

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienaufbau

#### Studie A: Genetisch determinierte Hypertonie

#### Studie B: Spontane Proteinurie bei Hypertonie

#### Studie C: Salzsensitive Hypertonie

Diese Arbeit wurde in drei Substudien unterteilt: In **Studie A** untersuchten wir den Einfluss einer 4%-igen Cholesterin-Cholsäurediät auf die Gefäß- und Nierenfunktion bei der spontan hypertensiven Ratte (Spontaneously Hypertensive Rat, nachfolgend SHR). Die SHR entwickelt spontan, d.h. ohne weitere experimentelle Manipulation und unter einer Normaldiät, einen genetisch determinierten Bluthochdruck. Der Phänotyp dieser Tiere wurde mit dem der normotensiven gesunden Wistar-Ratte verglichen.

In **Studie B** überprüften wir den Einfluss einer Cholesterindiät auf die Nierenfunktion und die Gefäßfunktion in einem Tiermodell, das auch spontan einen genetisch determinierten Bluthochdruck entwickelt, aber im Gegensatz zur SHR (Arendshorst et al., 1979) eine signifikante Albuminurie und eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate jedes einzelnen Nephrons (single-nephron glomerular filtration rate, SNGFR) zeigt (Rovira Halbach et al., 1986; Fassi et al., 1998). Daher verglichen wir den Phänotyp der München-Wistar-Frömter-Ratte (Munich-Wistar-Frömter, nachfolgend MWF) mit dem der normotensiven Wistar-Ratte.

**Studie C** hatte zum Ziel, die Auswirkung eines oral wirksamen ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten (LU135252, Knoll AG, Ludwigshafen) auf die Gefäß- und die Nierenfunktion bei einem Tiermodell mit salzsensitivem Bluthochdruck, der salzsensitiven Sabra-Ratte (Sabra Salt-Sensitive (SBH/y), nachfolgend SBH), und deren Kontrollstamm, der salzresistenten Sabra-Ratte (Sabra Salt-Resistant (SBN/y), nachfolgend SBN) zu bestimmen (Yagil et al., 1996).

## 2.2 Versuchstiere

Für diese Studie wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet:

**SHR/Mol** wurden im Alter von 10 Wochen von M&B A/S (Ry, Dänemark) geliefert. Diese Zuchtlinie wurde ursprünglich an der Kyoto School of Medicine (Kyoto, Japan) begründet (Okamoto et al., 1963), am National Institute of Health (NIH, Bethesda, USA) weitergeführt und 1977 von M&B A/S bei Generation F39 übernommen.

Die **MWF/Fub**-Ratten entstammen unserer Zuchtkolonie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF) der Freien Universität Berlin, die 1996 mit MWF/Ztm-Tieren aus Generation F45 begründet wurde. Seit 1978 züchtete das Zentrale Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover diese Tiere als Inzuchtstamm MWF/Ztm weiter (Hackbarth, 1980). Beim MWF-Stamm handelte es sich ursprünglich um eine Sublinie des Ivanovas-Wistar-Stammes, der von Frömter und Mitarbeitern auf oberflächlich gelegene Nierenkörperchen hin selektiert worden war (Rittinghausen, 1985).

Die **Wistar/Han**-Ratten wurden im Alter von 10 Wochen von der Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde erworben. Der Wist/Han-Rattenstamm wurde im Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover begründet.

**SBH/y**- und **SBN/y**-Ratten entstammen aus der Zuchtkolonie des Barzilai Medical Center (Ben-Gurion University, Ashkelon, Israel), wo sie aus der ursprünglichen Sabra-Zuchtlinie (Ben-Ishay et al., 1980) nach den Merkmalen Normotonie und Anfälligkeit bzw. Resistenz auf die Entwicklung eines Hypertonus nach Salzbelastung mit DOCA-Salz (Deoxykortikosteronazetat) ingezüchtet wurden (Yagil et al., 1996).

Die Versuchstiere wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) und dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin in Übereinstimmung mit den Institutsvorschriften untergebracht. Dabei wurden jeweils vier Tiere in Makrolon-Standardkäfigen Typ IV (40 x 60 x 25 cm) mit Einstreu aus Weichholzgranulat unter Kunstlicht mit einer zwölfstündigen Dunkelphase von 19.00 bis 7.00 Uhr

gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22°C und die relative Luftfeuchtigkeit 75%. Leitungswasser und Futterpellets standen *ad libitum* zur Verfügung.

An die Tiere der **Studie A** und **B** (genetisch determinierte Hypertonie bzw. spontane Proteinurie) wurde nach einer vorhergehenden zufälligen Aufteilung in Gruppen (n=8) entweder eine Standarddiät (SD) (Altromin 1324 Haltungsfutter, Altromin GmbH, Lage) oder eine Cholesterin-Cholsäurediät (ChD) (Ssniff S11 R-Z Ka 10mm inkl. 4% Cholesterin und 1% Gallensäure, Sondermischung S 8159-S 060, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) verfüttert (Chiang et al., 1998; Chinellato et al., 1994). Zum Zeitpunkt der Aufteilung in Gruppen waren die Tiere 15 Wochen alt, bei Opferung 23 Wochen. Alle Tiere der ChD-Gruppen erhielten bis zur Tötung für 8 Wochen eine Cholesterindiät.

Die Tiere der **Studie C** (salzsensitive Hypertonie) wurden im Alter von 8 Wochen nach dem Zufallsprinzip auf drei Gruppen pro Stamm (n=10) verteilt: der ersten Gruppe (DOCA) wurde zunächst subkutan ein Pellet (Innovative Research, Tampa, Florida, USA) implantiert, das kontinuierlich 75mg DOCA (Deoxykortikosteronazetat) freisetzt; anschließend wurden sie acht Wochen lang salzbelastet (1% NaCl im Trinkwasser *ad libitum*) (Yagil et al., 1998). Die zweite Gruppe (DOCA-LU) erhielt zusätzlich LU135252 (50mg/kg/d), das über das Futter zugeführt wurde. Eine dritte Gruppe wurde scheinoperiert und wurde nicht behandelt.

Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuche wurde unter der Tierversuchsnummer „00369/98“ des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin genehmigt.

## 2.3 Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck (SBD) wurde bei allen Tieren analog zur Methode nach Riva-Rocci beim Menschen mit der sogenannten „tail-cuff“-Methode gemessen (Rhoden et al., 1975). Diese nicht-invasive Methode ist leicht durchführbar und stellt bei Ratten eine gute Alternative zu invasiven Methoden dar (Abernathy, 1995). Dabei wurden die Ratten entweder im Wachzustand in einer Röhre aus Polyacryl liegend in einer Wärmebox (~ 35°C) warmgehalten oder in einer kurzen Äthernarkose auf ein Heizkissen gelegt. Über eine Druckmanschette und einen

Pulsaufnehmer wurde computergestützt eine Pulsationskurve der Schwanzarterie erstellt und dadurch der SBD bestimmt (Non-Invasive Blood Pressure Monitor, Semi-Automatic, 209000-series, TSE Technical&Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg). Die nicht narkotisierten Ratten wurden zwei Tage lang an den Versuchsablauf gewöhnt, die Messungen des darauffolgenden dritten Tages schließlich für die Studien verwendet. An jedem Versuchstag wurden drei Messungen pro Tier durchgeführt und der Mittelwert dieser Messwerte bestimmt.

Die Blutdruckwerte der Tiere der **Studie A** und **B** wurden am Beginn und am Ende der achtwöchigen Cholesterindiät (d.h. im Alter von 15 und 23 Wochen) unter Äthernarkose gemessen. Eine Gruppe (n=8) wurde sowohl in Narkose als auch im Wachzustand gemessen. Die Messungen der **Studie C** wurden durchgehend an nicht narkotisierten Ratten nach 8 Wochen Salzbelastung bzw. Behandlung mit LU135252 gemacht (d.h. im Alter von 16 Wochen).

## 2.4 Biochemische Urin- und Blutanalysen

Nach Beendigung der Blutdruckmessungen wurden die Ratten gewogen und über 24h in metabolische Käfige (Ehret) gesetzt, um Urin zu gewinnen. Diese Proben wurden aliquotiert und auf -20°C gelagert, um später folgende Parameter bestimmen zu können: Urinvolumen, Kreatinin, Harnstoff, Natrium, Endothelin-1, Protein- und Albuminausscheidung ( $U_{Alb}$ ). Die  $U_{Alb}$  wurde mithilfe eines ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) gemessen, wobei ein rattenspezifischer Antikörper (ICN Biomedicals, Eschwege) verwendet wurde. Die Proteinausscheidung durch den Urin wurde mit der „Bradford“-Methode ermittelt (Bradford, 1976; Kruger, 1994). Endothelin-1 wurde mit einem Enzym-Immunoassay (Immundiagnostik GmbH, Bensheim) bestimmt (Rothermund et al., 2001).

Arteriell Blut wurde durch eine Punktion der Aorta abdominalis gewonnen, um die folgenden Parameter zu bestimmen: Gesamt-Cholesterin, Triglyceride, HDL- und LDL-Cholesterin, Albumin, Gesamt-Eiweiß, C-Reaktives Protein, Kreatinin, Harnstoff und Glukose. Das Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme in ein Eppendorfgefäß mit EDTA überführt und bei 4°C und 6000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Gerätebau Eppendorf GmbH,

Engelsdorf). Danach wurde das Plasma bei 4°C abpipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Das Serum wurde bei 20°C Raumtemperatur abpipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.5 Organentnahme

Nachdem die Ratten entweder durch Ätherinhalation (**Studie A** und **B**) oder intraperitoneale Pentobarbitalinjektion (50mg/kg i.p.; Sigma, Deisenhofen; **Studie C**) in Narkose versetzt worden waren, wurde zunächst das Abdomen eröffnet und durch eine Punktion der Aorta abdominalis so viel Blut wie möglich entnommen. Dann wurde der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet und das Tier durch die Entnahme des Herzens an der Herzbasis getötet. Die Aorta thoracica wurde sofort freigelegt, indem zunächst an der dorsalen Thoraxwand das Zwerchfell eingeschnitten und dann im Bindegewebsstreifen zwischen Oesophagus und Aorta entlang nach kranial präpariert wurde. Dieser wurde durchschnitten und zusammen mit der Lunge zur Seite geklappt. Nun wurde die Aorta vorsichtig entnommen, indem man auf der Wirbelsäule im aortalen Bindegewebe nach kaudal präparierte. Nach der Entnahme wurde die Aorta unmittelbar in kalte (4°C) Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung mit der folgenden Zusammensetzung gelegt (in mmol/l): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.5 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> und 6.1 Glucose (Krebs et al., 1932; Neeley et al., 1967). Nachdem die anderen Organe entnommen waren (s.u.), wurde die Aorta in einer mit kalter Krebslösung gefüllten Petrischale auf einem Silikonbett mit einer Mikro-Federschere vom perivaskulären Fett- und Bindegewebe befreit. Mit einem Skalpell wurden nun 3-4mm breite Ringe geschnitten. Pro Tier wurden zwei Aortenringe für die Organbad-Versuche verwendet.

Das Herz wurde in Natriumchlorid-Lösung (0.9%) gespült und gewogen (Sartorius L610D, Sartorius GmbH, Göttingen). Der rechte Ventrikel wurde abpräpariert und ebenfalls gewogen, der linke Ventrikel wurde horizontal geschnitten und in Dubosq-Brasil-Lösung fixiert. Beide Nieren wurden entnommen, von der Kapsel befreit und gewogen. Die rechte Niere wurde horizontal geschnitten und in Dubosq-Brasil-Lösung fixiert. Danach wurde die linke Niere vertikal in zwei Hälften geschnitten, Cortex und Medulla voneinander getrennt, in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Milz wurde entnommen und auf die gleiche Weise eingefroren, Aorta abdominalis und ein Lebergewebestück in Dubosq-Brasil-Lösung fixiert.

## 2.6 Organkammer-Experimente

### 2.6.1 Versuchsaufbau

Die Aortenringe wurden horizontal zwischen zwei Schlaufen aus chirurgischer Seide in den Organkammern (Schuler Organ Bath (4-position) Isometric Version Type 809, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) aufgehängt. Die Kammern waren mit 25 ml Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung ( $37^{\circ}\text{C}$ , pH 7.4) gefüllt, welche mit Carbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) begast wurde. Eine Schlaufe war an einem Haken befestigt, die andere an einem Kraftaufnehmer (HSE Isometric Force Transducer F30 Type 372, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten), um die isometrische Spannungsänderung aufzeichnen zu können. Hierzu musste das Signal zunächst verstärkt werden (DBA Plugsys DC Bridge Amplifier Module Type 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten), um es dann mithilfe von X/Y-Schreibern auf Millimeterpapier aufzeichnen zu können (Clevite Brush Mark 260 Model 15636706437, Clevite Corporation, Brush Instruments Division, Cleveland, Ohio, USA; Gould Recorder 220, Model 15-6327-58, Gould Inc., Instruments Division, Cleveland, Ohio, USA). Nach einer einstündigen Äquilibrationszeit wurden die Gefäßringe schrittweise gedehnt, bis die optimale Ruhespannung von ca. 2,5 g (Luscher et al., 1988) erreicht war. Um die Integrität der glatten Gefäßmuskulatur sicherzustellen, wurden die Aortenringe vor Beginn der Experimente zweimal mit 60 mmol/l Kaliumchlorid kontrahiert.

### 2.6.2 Versuchsprotokolle

#### Studie A und B

#### Endothel-abhängige Relaxationen auf Acetylcholin

Nach einer Äquilibrationsphase von 30 Minuten wurde der folgende Versuch durchgeführt: Die Gefäßringe wurden mit  $10^{-6}$  mol/l Phenylephrin vorkontrahiert und nachfolgend kumulativen Konzentrationen von Acetylcholin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l,

n=8 pro Gruppe) ausgesetzt. Um die Endothel-unabhängigen Relaxationen beurteilen zu können, wurde  $10^{-2}$  mol/l Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) verwendet (Van de Voorde et al., 1986; Wanstall et al., 1992). Vor Beginn der nachfolgenden Experimente wurden die Bäder mehrfach mit Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült und die Gefäße äquilibrierten für weitere 30 Minuten.

### **Kontraktionen auf Phenylephrin**

Mit Phenylephrin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l), einem kontraktilem Agonisten, der vorwiegend auf  $\alpha_1$ -Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur wirkt, wurden die Gefäßkontraktionen (n=8 pro Gruppe) bestimmt. Die Gefäßringe wurden 20 Minuten lang mit  $10^{-4}$  mol/l L-NMMA ( $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin, einem kompetitiven Inhibitor aller drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase [nitric oxide synthase, NOS]) und  $10^{-5}$  mol/l Indomethacin (1-[p-Chlorobenzoyl]-5-Methoxy-2-Methylindole-3-Acetic Acid, einem nicht-selektiven Cyclooxygenase-Inhibitor) vorbehandelt, um die basale Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid bestimmen zu können. In einem weiteren Experiment wurde die zusätzliche Wirkung von  $10^{-5}$  mol/l LU135252 (einem  $\text{ET}_A$ -Rezeptorantagonisten, präinkubiert für 20 Minuten) auf die Kontraktionsantwort überprüft.

## **Studie C**

### **Endothel-abhängige Relaxationen auf Acetylcholin**

Nach einer Äquilibrierungsphase von 30 Minuten wurde der folgende Versuch durchgeführt: Die Gefäßringe wurden mit  $10^{-6}$  mol/l Phenylephrin vorkontrahiert und nachfolgend kumulativen Konzentrationen von Acetylcholin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l, n=10 pro Gruppe) ausgesetzt. Um die endothelunabhängigen Relaxationen beurteilen zu können, wurde  $10^{-2}$  mol/l Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) verwendet (Van de Voorde et al., 1986; Wanstall et al., 1992). Vor Beginn der nachfolgenden Experimente wurden die Bäder mehrfach mit Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült und die Gefäße äquilibrierten für weitere 30 Minuten.

### ET<sub>B</sub>-Rezeptorstimulation durch Sarafotoxin S6c

Um die Relaxationsantwort auf eine Stimulation des Endothelin-TypB (ET<sub>B</sub>)-Rezeptors untersuchen zu können, wurden die Gefäßringe für 20 Minuten mit 10<sup>-5</sup> mol/l LU135252 inkubiert, mit 10<sup>-6</sup> mol/l Phenylephrin vorkontrahiert und mehreren Konzentrationen (10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-7</sup> mol/l) Sarafotoxin S6c (einem ET<sub>B</sub>-selektiven Agonisten) ausgesetzt (n=5 pro Gruppe). Dies wurde zweimal mit einer zusätzlichen Inkubation (20 min) von 10<sup>-4</sup> mol/l L-NMMA bzw. 10<sup>-5</sup> mol/l Indomethacin wiederholt.

### Kontraktionen auf Endothelin-1

Endothelin-1 ist ein Peptid, das über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auf der glatten Gefäßmuskulatur eine Vasokonstriktion bewirkt. Es wurden die Kontraktionsantworten der isolierten Aortenringe auf kumulative Konzentrationen von Endothelin-1 (10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-6</sup> mol/l, n=5 pro Gruppe) getestet.

### 2.6.3 Substanzen

Die folgenden Substanzen wurden für die *in vitro*-Experimente verwendet und in die Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gegeben: Acetylcholinhydrochlorid, Phenylephrin, Natriumnitrit, Indomethacin (alle Sigma, Deisenhofen), L-NMMA, Sarafotoxin S6c (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) und Endothelin-1 (Alexis Biochemicals Deutschland GmbH, Grünberg). LU135252 [(+)-(S)-2-(4,6-Dimethoxy-Pyrimidin-2-Yloxy)-3-Methoxy-3,3-Diphenyl-Propionic Acid], das aktive (+)- Isomer von LU127043, ein selektiver ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist, wurde uns von der Knoll AG, Ludwigshafen zur Verfügung gestellt. Indomethacin wurde in NaHCO<sub>3</sub> und Ethanol gelöst und dann in demineralisiertem Wasser verdünnt. LU135252 wurde in NaOH und demineralisiertem Wasser aufgelöst. Sarafotoxin S6c wurde in AcOH und demineralisiertem Wasser gelöst. Alle übrigen Substanzen wurden in demineralisiertem Wasser gelöst. Alle Konzentrationen sind als Endkonzentrationen im Organbad (25ml Volumen) in mol/l angegeben.

## 2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean, SEM) angegeben und n beschreibt die Anzahl der verwendeten Tiere. Die

Relaxations- und Kontraktionskurven wurden auf dem Millimeterpapier ausgemessen und als Prozentwert der Phenylephrin-Vorkontraktion (für alle Relaxationen) bzw. der Kontraktionsantwort auf Kaliumchlorid (für alle Kontraktionen) berechnet. Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC), die Effektivdosis 50 (halbmaximale Wirkung, ED<sub>50</sub>; als negativer Logarithmus: pD<sub>2</sub>) und die maximale Wirkung (E<sub>max</sub>) wurden mithilfe einer nicht-linearen Regressionsanalyse berechnet (FitLab C. Binggeli, Zürich, Matlab © 5.0) (DeLean et al., 1978). Die Varianzanalyse wurde mit einer ANOVA (analysis of variance) und einer zusätzlichen Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Um zwei Mittelwerte miteinander vergleichen zu können, wurde der Zweistichproben-*t*-Test für unabhängige Stichproben (unpaired *t*-test) angewendet. Die Analysen wurden mit StatView © für Windows V.5.0.1 auf einem IBM-kompatiblen PC berechnet. Ein  $P < 0.05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Alle Diagramme wurden mit Sigma Plot © V.4.0.1 erstellt.