

3. Methodik

3.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an männlichen Mäusen verschiedener Mauspopulationen durchgeführt. Folgende Mausstämme wurden untersucht :

- 1) 19 human Endothelin-1 überexprimierende Mäuse der Line 856 ($35,5 \text{ g} \pm 6 \text{ g}$),
- 2) 12 Wildtypmäuse (Kontrollmäuse zu den ET-1 überexprimierenden Mäusen) ($35,5 \text{ g} \pm 7,5 \text{ g}$),
- 3) 17 eNOS Knock-Out Mäuse ($31,5 \text{ g} \pm 12,5 \text{ g}$),
- 4) 5 C57Bl6 Mäuse ($30 \text{ g} \pm 3 \text{ g}$), die als Kontrollgruppe der eNOS Knock-Out Mäuse fungierten und
- 5) 4 NMRI-Mäuse ($44 \text{ g} \pm 4 \text{ g}$).

Es handelte sich bei allen untersuchten Mäusen um ausgewachsene Tiere. Die Endothelin-1 überexprimierenden Mäuse waren zwischen 3 bis 5 Monate alt. Das Alter der anderen Mäuse schwankte zwischen 3 und 13 Monaten.

3.1.1. Human Endothelin-1 (ET-1) überexprimierende Mäuse

3.1.1.1. Transgene Konstruktion und Generierung der Mäuse

Die verwendeten transgenen ET-1 überexprimierenden Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Franz Theuring (Schering Research Laboratories, Deutschland, 14195 Berlin) aus einem NMRI-Mausstamm hergestellt [52]. Die Generierung der ET-1 Mäuse erfolgte durch Isolierung humaner ET-1 DNA aus einer Genomsammlung von Blutlymphozyten und anschließender Veränderung des NMRI-Mausgenoms auf Stammzellebene [52].

3.1.1.2. Bestimmung der Endothelin-1 überexprimierenden Mäuse

Die Genotypisierung der transgenen ET-1 Mausspezies erfolgte im Labor des Herstellers aus einer Probenbiopsie des Schwanzteils der Tiere. Aus dieser wurde die DNA isoliert und durch spezifische Primer für das humane ET-1 Protein im PCR (polymerase chain reaction) und

Southern Blot Analyseverfahren nachgewiesen. Die quantitative Bestimmung des humanen ET-1 Peptids erfolgte mittels eines für humanes Endothelin-1 spezifischen [^{125}I] Radioimmunoassay (Endothelin 1,2 ;high sensitivity; [^{125}I] assay; Amersham International, Little Chalfont, UK). Um die Qualität der experimentell gewonnenen Daten zu maximieren und um mögliche Fehlerquellen in der Versuchstierauslieferung zu isolieren, wurden vom Herstellerlabor die Versuchstiere vor der Übergabe an das Versuchslabor verschlüsselt, das heißt, es war nicht bekannt, ob es sich bei den gelieferten Versuchstieren um Wildtypmäuse oder ET-1 überexpressierende Mäuse handelte. Nach Abschluss der Versuchsreihen fand ein Vergleich anhand von Versuchsprotokollen unsererseits und Decodierungsprotokollen seitens des Herstellerlabors statt, um die Tieridentität von Kontroll- und ET-1-Versuchsmäusen zu erfahren. Weiterhin wurden nach Beendigung jedes Versuches Organbiopsien, bei Mäusen der ET-1 und der entsprechenden Kontrolltiergruppe, von der Leber sowie rechter Niere entnommen und diese kryokonserviert. Aus den gewonnenen Biopsien wurden randomisiert 4 Kontroll- und 4 ET-1 Mausbiopsien ausgewählt, nach den Versuchsprotokollnummern verschlüsselt und zur Analyse an das institutseigene Labor gesandt. Anschließend fand ein Vergleich der eingesandten Proben mit den Analyseergebnissen des Herstellerlabors statt. Die eingesandten Proben wurden vom Labor fehlerfrei den richtigen Versuchstiergruppen, Kontroll- oder ET-1 Mausstamm, zugeordnet.

3.1.2. NMRI-,C57Bl6-, eNOS Knock-Out Mäuse

Als Kontrolltiere der eNOS Knock-Out Mäuse dienten C57Bl6 Mäuse, die von der Firma Tierzucht Schönwalde GmbH (Hauptstrasse 62,16352 Schönwalde, Deutschland) geliefert wurden. Die eNOS Knock-Out Mäuse stammten aus der Zucht von Herrn Dr. H.M. Stauss (Johannes Müller Institut der Charité, Berlin, Deutschland). Die NMRI-Mäuse wurden vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Postfach 330013, 14191 Berlin, Deutschland) geliefert. Der Nachweis der Identität der Mäusestämme und Spezifität bezüglich ihres Merkmals erfolgte anhand laboreigener bzw. mitgelieferter Laborprotokolle.

3.2. Haltung und Ernährung der Mäuse

Alle Mäuse wurden vor den Versuchen unter standardisierten Umweltbedingungen gehalten und ernährt. Die Mäuse lebten in einem Nacht-Tag-Zyklus mit einer Lichtperiode von 6 Uhr bis 18 Uhr und einer Raumtemperatur von 20 °C. Sie erhielten eine standardisierte Diätfestnahrung in

Form von Pellets nach den internationalen Richtlinien von Altromin International (Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland) und Aqua ad libitum.

3.3. Vorbereitung der Mäuse zum Versuch

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Tiere unter Nahrungskarenz gehalten, um eine gleiche Ausgangssituation zu schaffen. Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 0,09 ml/100g Körpergewicht (KG) einer körpertemperierten Kombinationsnarkoselösung, bestehend aus 5 mg/ml Ketaminhydrochlorid [Ketanest © (50 mg/ml), Parke-Davis, Freiburg, Deutschland] und 0,032 mg/ml Xylazinhydrochlorid [Rompun © 2 %, Bayer, Bayer Leverkusen, Deutschland]. Um das Injektionsvolumen genauer dosieren zu können, wurden gleiche Anteile physiologischer Natriumchloridlösung sowie Narkoselösung in einer 1 ml Spritze aufgezogen. Zehn Minuten nach Narkotisierung und Erlöschen der Abwehrreflexe wurden die Mäuse in Rückenlage auf einem thermostatierbaren Operationstisch (Eigenbau Arbeitsgruppe Dr. med. Bert Flemming, Johannes Müller Institut für Physiologie, Charité, Berlin, Deutschland) gelagert. Intraoperativ erfolgte die Nachgabe des Narkotikums 40 – 50 Minuten nach Operationsbeginn oder wenn die Barthaare der Mäuse anfangen zu wackeln, als Hinweis auf ein zu flaches Narkosestadium. Das Nachgabevolumen des Narkotikums betrug 0,05 ml und wurde intraperitoneal injiziert oder auf den Darm getropft.

3.4. Operatives Vorgehen

Die Mäuse wurden in Rückenlage gelagert und die Extremitäten in Spreizstellung fixiert. Die Mäuse atmeten spontan. Die abdominale Cutis sowie die darunter befindliche Muskulatur wurden unter mikroskopischer Sicht (Mikroskop Modell MZ 6, Leica©, Heerbrugg, Schweiz) durchtrennt. Bei paramedianer Schnittführung erfolgte, von kaudal in Höhe des Ansatzes der unteren Extremitäten, nach kranial, bis circa 5 mm proximal des Angulus sternalis, die Eröffnung des Abdomens. Nach Eröffnung der Cavitas abdominalis führten wir eine Spülung der Bauchhöhle mit körpertemperierter physiologischer Natriumchloridlösung durch. Um das Operationsfeld besser einsehen zu können, wurde der Blasenurin mit einer 1 ml Einwegspritze abpunktiert. Unter Verwendung von zwei mit 0,9% Natriumchloridlösung benetzten Tupfern wurden stumpf die Jejunum- und Ileumschlingen rechtsseitig auf einem benetzten Mullstück

gelagert sowie mit einer weiteren benetzten Mullschicht abgedeckt. Dadurch wurden die Darmabschnitte in physiologischem Milieu gelagert und vor Austrocknung geschützt.

Anschließend wurde die Aorta abdominalis von subphrenisch bis in Höhe der Bifurcatio aortae freipräpariert. Als nächstes wurden die Arteria (A.) renalis sinister, die Vena (V.) renalis sinister und die A. testicularis dargestellt. Eine geringfügige Mobilisation der linken Niere aus ihrem Nierenlager wurde unter Schonung der sichtbaren nervalen Innervationstrukturen stumpf mit Tupfern vorgenommen. Die Mobilisierung der linken Niere aus dem Nierenlager war vor Justierung der Messgeräte nötig, um anatomische Gefäßvariationen und potentielle Blutungsquellen frühzeitig zu erkennen.

Anschließend erfolgte die Mobilisierung und Freipräparation der subphrenisch gelegenen Aorta abdominalis auf einer Distanz von circa 5 mm nach distal, um an dieser Stelle eine Drossel (Drossel, Eigenbau der Arbeitsgruppe Dr. med. B. Flemming, Johannes Müller Institut, Charité, Berlin, Deutschland) mittels eines chirurgischen und mehrerer einfacher Knoten zu fixieren. Die Entwicklung und Herstellung erfolgte nach eigenem Entwurf der Arbeitsgruppe. Die Drossel bestand aus einem druckstabilen 1,5 - 2 mm dicken Steg mit eingearbeitetem Nahtmaterial und ließ sich zu einem Ring schließen. Mittig auf dem Steg wurde ein elastischer Silikonballon befestigt, der von außen über einen Katheter durch Zugabe isotoner Kochsalzlösung suffliert oder desuffliert werden konnte. Dadurch war es möglich, den umschlossenen Aortendurchmesser an dieser Stelle zu ändern und somit den renalen Perfusionsdruck (RPP) zu regulieren. Die Drossel wurde an eine computergesteuerte Regeleinheit gekoppelt, die eine präzise Einstellung der vorgegebenen RPP Sollwertkurven vornahm.

Nach Fixierung der Drossel wurde die Aorta abdominalis unter Gebrauch einer sehr feinen, spitz zulaufenden Pinzette (Modell FD 281 R, Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland) von ca. 3 mm proximal der Bifurcatio aortae bis ca. 3 mm distal des Abganges der Arteriae (Aa.) renalis mobilisiert. Es folgte eine kurzzeitige aortale Fixierung von zwei Gefäßklemmen (Modell FD 560 R, 0.30 x 0.40 mm Biemer-Clip, Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland) mit einer Biemer-Clip Pinzette (Modell FD 568 R, Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland). Dadurch war es möglich die Aorta abdominalis auf einer Distanz von ca. 15 mm mechanisch zu okkludieren und in diesem Bereich mit einer Gefäßschere translaminär bis in das Gefäßlumen hinein zu inzidieren. Im Anschluss führten wir eine intraaortale Einbringung, eines im heißen Ölbad ausgezogenen Polyurethan-Katheters durch (Modell MRE-400 Micro-Renathane (MRE)© Tubing, Braintree Inc., Braintree, ME, USA), der von infrarenal bis zum Abgang der Aa. renalis vorgeschoben und

mit Gewebekleber (Histoacryl©, Braun, Melsungen, Deutschland) extern fixiert wurde (siehe Abbildung 6). Um Thrombenbildung im Lumen des Katheters vorzubeugen wurde dieser mit 0,2 ml einer 2% Heparinlösung (25.000 I.E.-Heparin-Natrium, Ratiopharm©, Ulm, Deutschland) gespült und danach an einen Druckmesswandler (Einwegmesswandler Typ DT-XX mit integrierten Critiflex Spülsystem, Pfrimmer-Vigo GmbH & Co. KG, Erlangen, Deutschland) angeschlossen.

Als nächstes erfolgte die Positionierung von zwei fiberoptische Lichtleiterkabeln mit einem Durchmesser von 500 µm (Modell PF500, Fiberware®, Berlin, Deutschland) im Nierengewebe. Das cortikale fiberoptische Lichtleiterkabel wurde 1 mm und das medulläre fiberoptische Lichtleiterkabel 2 mm subkapsulär mittels Feinmanipulatoren (Modell M3301R, World Precision Instruments©, Sarasota, Florida, USA) von ventral, in Höhe des oberen Nierenpols, plaziert. Im Anschluss wurden die A. und V. renalis sinister unter mikroskopischer Sicht mit einer Feinpinzette voneinander separiert. Ein Ultraschallflussmesskopf (Modell .5 V-Serie für T-106, Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA) wurde zur Ultraschalllaufzeitdifferenzmessung an der A. renalis sinistra bzw. bei günstigerer anatomischer Lage an der V. renalis sinister unter Verwendung eines zweiten Mikromanipulators (Modell M3301R, World Precision Instruments©, Sarasota, Florida, USA) positioniert. Der Raum zwischen dem gewählten Gefäß und dem Ultraschallmesskopf wurde, um ein besseres Messsignal ableiten zu können, mit Ultraschallgel bzw. mit isotoner Kochsalzlösung aufgefüllt. Die gesamte Operationsdauer betrug maximal 30 bis 40 Minuten (siehe Abbildung 6 - schematischer Versuchsaufbau).

3.5. Versuchsanordnung

Die rektal gemessene Körperkerntemperatur der Mäuse vor Beginn der Operation betrug durchschnittlich 37,2 – 38 °C. Die Temperatur des Operationstisches wurde auf 40 °C eingestellt und konnte über eine LCD-Temperaturschaltstufe (Modell LCD-Temperaturschaltstufe, Conrad Electronics, Hirschau, Deutschland) reguliert werden. Entstandene Wärmeverluste der Tiere konnten somit ausgeglichen und die Körpertemperatur der Tiere annähernd gleich gehalten werden.

Die Manschette (Drossel), die die Aorta extern komprimierte, wurde während der Versuchsphasen mit einem Druck-Perfusions-Servomechanismus gekoppelt, um den anliegenden

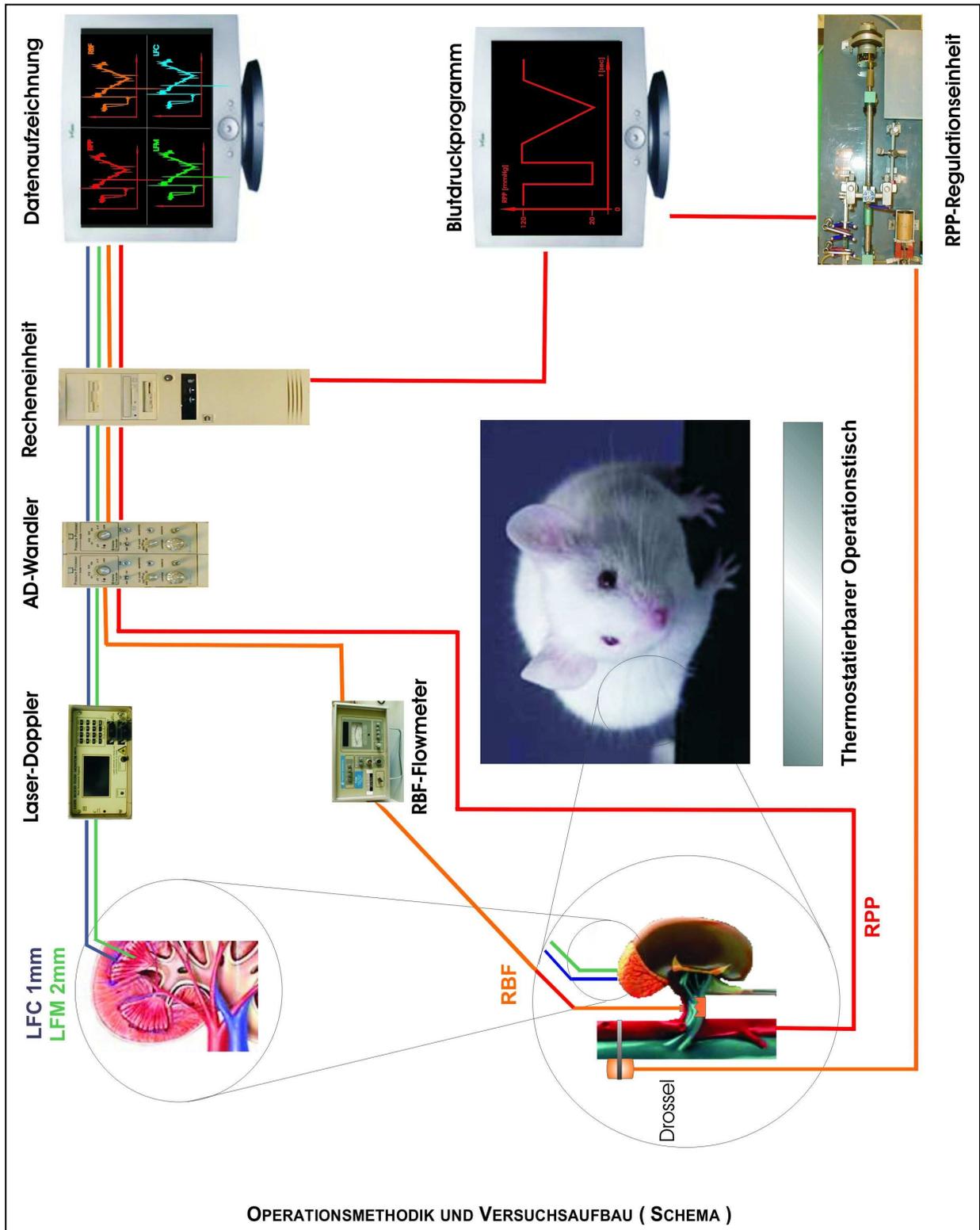


Abbildung 6 schematisierter Versuchsaufbau

renalen Perfusionsdruck (RPP) als Regelgröße stufenlos in den Versuchsphasen regulieren und konstant halten zu können.

Über den in der Aorta abdominalis fixierten Katheter mit angeschlossenem Druckmesswandler wurde kontinuierlich der anliegende RPP (Istwert) gemessen und über einen Analog-Digital-Wandler einem angeschlossenen Computer übermittelt. Hier erfolgte der Vergleich mit dem vorgegebenen Drucksollwert. Bei Abweichung des RPP konnte durch die Servoeinheit über Änderung des Drosselvolumens der RPP genauestens eingestellt werden. Für die Versuchsphasen dienten vorgegebene Drucksollwertkurven als Vergleichssignal. Der Druck-Perfusions-Servomechanismus (Eigenbau der Arbeitsgruppe Dr. med. B. Flemming, Johannes Müller Institut, Charité, Berlin, Deutschland) bestand aus einem 12-Volt Getriebemotor, der eine Gewindespindel antrieb, die mit einer Spritze gekoppelt war. Durch diese Vorrichtung konnte physiologische Kochsalzlösung aus einer 1 ml Spritze (primäres Flüssigkeitsreservoir) in oder aus der angeschlossenen Drossel verlagert werden. Ein paralleles Flüssigkeitsreservoir (sekundäres Flüssigkeitsreservoir) befand sich in einem elastischen Silikonschlauch, der durch eine Magnetklemme schnell komprimiert oder entlastet werden konnte.

Bei Differenzen von Ist- und Sollwert wurde über diesen Servomechanismus durch Grob- und Feineinstellung der renale Perfusionsdruck (RPP) reguliert. Bei Überschreitung des RPP über den gemessenen Sollwert erhielten der 12-Volt Motor und die Magnetklemme über einen Analog-Digital-Wandler sowie Transistorenverstärker ein elektrisches Signal. Da sich Flüssigkeiten nicht komprimieren lassen, fand die Verlagerung eines großen Volumens mit geringer Geschwindigkeit aus der Spritze in die periaortale Manschette und eines geringen Volumens mit hoher Geschwindigkeit aus dem durch die Magnetklemme komprimierten Silikonschlauch statt.

Der Vortrieb der Spritze bzw. Schluss der Magnetklemme erfolgte solange bis der vorgegebene Sollwert des RPP erreicht wurde. Bei Unterschreitung des Sollwertes konnte Volumen unter Verwendung der erläuterten Prinzipien aus der Manschette zurück in die Flüssigkeitsreservoir verlagert werden, die Aorta wurde somit dekomprimiert und der renale Perfusionsdruck (RPP) kontrolliert erhöht.

Durch Abstimmung der Motorleistung (Geschwindigkeit und Startpunkt) und des Hubes der Magnetklemme war eine Regulation innerhalb einer Schwankung von etwa 1 mmHg zwischen der Sollwertkurve und der mittleren renalen Druckkurve möglich.

3.6. Zeitliches Vorgehen

Eine Kalibrierung und Funktionsprüfung aller Messgeräte fand vor Beginn der Versuchsreihen statt. Dies erfolgte bei den Lasern mit einer Lösung des Firmenherstellers. Der Ultraschallmesskopf wurde 1 Stunde lang in eine statische Flüssigkeit (Wasser) getaucht und dann kalibriert, während der Druckmesskopf mit einem Manometer überprüft wurde. Vor Beginn eines jeden Versuches fand nach Implantation der Geräte in vivo eine circa 10 min dauernde Stabilisierungsphase der abgeleiteten Fluxe statt, bis sich die durch die Implantation entstandenen Schwankungen auf ein stabiles Signal eingepegelt hatten.

Die Versuchsgruppe der ET-1 überexprimierenden Mäuse und der korrespondierenden Kontrollgruppe (Wildtypmäuse) wurden folgendem Versuchsprotokoll unterzogen:

Zehn Minuten nach intraperitonealer Injektion des Narkotikums, Lagerung der Versuchstiere in Rückenlage begann die 30 bis 40 Minuten dauernde Operation und Implantation der Messgeräte. Während der Operation traten, bedingt durch das Vorgehen, leichte Blutverluste auf. Die Tiere erhielten nach der Aufnahme des intraaortalen Katheters über den gesamten Versuchsverlauf durch einen zeitvolumenkonstanten Infusomat (Lineomat, MLW, Deutschland), intraarteriell eine 4% Albuminlösung (Humanalbumin, Baxter©, Unterschleißheim, Deutschland) mit 0,5 % des KG/h.

Nach Stabilisierung der Parameter wurde unter drei differenten Ausgangsbedingungen folgendes Versuchsprotokoll durchgeführt, das aus 2 Versuchsphasen bestand (siehe Abbildung 7).

1. Der erste Versuchszyklus wurde unter Ausgangsbedingungen und unter der oben genannten zeitvolumenkonstanten Infusion durchgeführt.
2. Nach Beendigung des ersten Versuchszykluses erfolgte die Volumenexpansion durch Bolusinfusion von 2% des Körpergewichtes einer 0,9 % Natriumchloridlösung in den intraaortal liegenden Katheter und eine Erhöhung des zeitvolumenkonstanten Infusion von 0,5% des KG/h auf 5% des KG/h.

3. Zu Beginn des dritten Versuchszykluses wurden 0,5 mmol/kg*KG Nitrit-Oxid-Synthase-Hemmer-Lösung (L-NAME©, NG-Nitro-L-Arginine-methylesterhydrochlorid, Alexis® Biochemicals, Deutschland) über den liegenden intraarteriellen Katheter injiziert und 0,2 ml einer physiologischen Kochsalzlösung, das dem doppelten Totraumvolumen des Katheters entsprach, nachgegeben.

Vor Beginn jeder dieser Versuchsphasen wurde eine 100 s bis 200 s dauernde Stabilisierungsphase aller Flussparameter durchgeführt. In der ersten Versuchsphase jedes Versuchszykluses wurde eine manuelle 30-Sekunden Abklemmung (Sprungreiz) durchgeführt, welcher ein 100 s bis 200 s dauerndes Beobachtungsintervall folgte. Der linke Teil der Abbildung 7 zeigt den schematischen Ablauf.

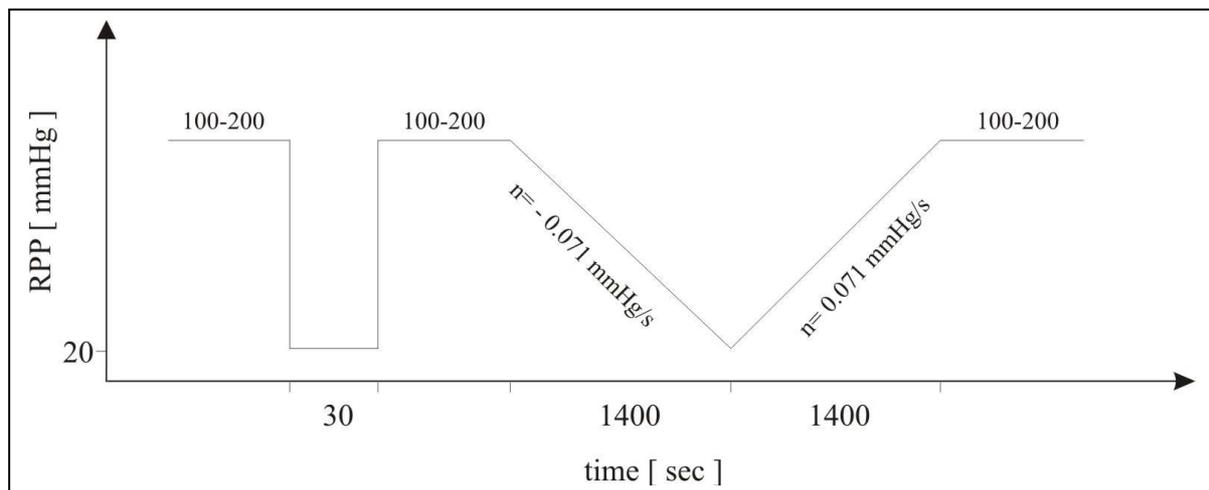


Abbildung 7 Versuchszyklus

Nach Anschluss der Drossel an den Druck-Perfusions-Servomechanismus wurde ein Steuerprogramm mit Drucksollwertkurven in Form von Rampen initiiert, dass über den Servomechanismus den RPP regulierte. Der RPP wurde in 1400 s (negativer Anstieg: $-0,071$ mmHg/s) von 120 mmHg auf 20 mmHg reduziert und anschließend in der gleichen Zeit von 20 mmHg auf 120 mmHg wieder erhöht mit einem Anstieg von $0,071$ mmHg/s (langsame Rampe). Ein vollständiger Versuchszyklus ist in der Abbildung 7 dargestellt.

Die Untersuchungen des renalen Blutdruck–Blutfluss Verhaltens bei rampenförmiger Änderung des RPP unter Ausgangsbedingungen, Volumenexpansion sowie L-NAME Gabe nach Volumenexpansion wurden bei den transgenen ET-1 überexprimierenden Mäusen und der

korrespondierenden Kontrollgruppe (Wildtypmäuse) durchgeführt, während die eNOS Knock-Out Mäuse den Versuchszyklus unter Ausgangsbedingungen und Volumenexpansion durchliefen. Bei den C57Bl6-Mäusen sowie NMRI-Mäusen wurde keine Volumenexpansion und L-NAME Applikation durchgeführt. Die 30 s dauernde Abklemmung erfolgte bei allen Tieren bis auf den C57Bl6 Mäusestamm.

Nach Beendigung aller Versuchszyklen wurden die Versuchstiere durch einen intrakardialen Scherenschnitt getötet und anschließend obduziert. Die Lage des intraaortalen Katheters, des Ultraschallmesskopfes wurde überprüft und Organbefunde erhoben. Während der Sektion erfolgte die Entnahme des Herzens, Teilresektion der Leber und der linken Niere. Die Maße des Herzens und der Niere wurden ermittelt. Die Lage der Spitzen der Lichtleiterkabel im Nierenparenchym wurde überprüft und nachgemessen.

3.7. Messungen und Registrierungen

3.7.1. Messungen

Während des gesamten Versuches wurden der renale Perfusionsdruck (RPP), der renale Blutfluss (RBF) sowie die Laserdopplersignale im Cortex (LFC) und Medulla (LFM) der Niere gemessen.

Die um das renale Gefäß der linken Niere liegende Ultraschallmesssonde wurde über einen Adapter an das Ultraschallmessgerät (Modell T106, Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA) angeschlossen.

Die kortikalen und medullären Laserdopplersignale wurden über fiberoptische Kunststoffleiterkabel im Nierenparenchym abgeleitet, die über Kupplungen mit dem Messgerät (MBF 3D, Moor Instruments Limited, England, Großbritannien) verbunden waren. In die Kupplungen wurde, um Lichtverluste zu vermeiden Gel (Optica Matching Gel, Moor Instruments Limited, England, Großbritannien) eingebracht. Mit Hilfe dieses Gerätes erfolgte die Messung des kortikalen und medullären Gehaltes an Erythrozyten und deren mittlere Geschwindigkeit durch Streulichterfassung in einem Gewebavolumen von etwa einem Kubikmillimeter. Über die Änderung der Frequenz des reflektierten Lichtes (Doppler-Effekt) konnten Aussagen über die Geschwindigkeit der Erythrozyten gemacht werden. Aus der Verrechnung dieser beiden Größen wurde ein flussabhängiges Signal gebildet und angezeigt.

Über den intraaortal liegenden Katheter mit angeschlossenen Druckabnehmer wurde der anliegende renale Perfusionsdruck (RPP) kontinuierlich gemessen.

Die Rektaltemperatur der Tiere wurde während des Versuches alle 30 min mit einem Digitalthermometer (Modell GTH 1160, Griesinger Electronics, Deutschland) gemessen.

3.7.2. Registrierungen

Sämtliche Messgeräte waren an einen 12-Bit-Analog-Digital-Wandler und dieser an einen PC (Intel ® 486 DX 33) angeschlossen. Die Abtastfrequenz der Parameter betrug 100 Hz. Die Datenmengen des renalen Perfusionsdrucks (RPP in mmHg), der kortikalen und medullären fieberoptischen Kunststofflichtleiter (LFC/LFM in AU) und des renalen Blutflusses (RBF in ml/min) wurden über den gesamten Versuch von einem Computerprogramm (Labtech Notebook, Laboratory Technologies Corporation, Wilmington, Northcarolina, USA) in 4 verschiedenen Bildschirmfenstern mit Momentan- und Mittelwerten graphisch dargestellt (siehe Abbildung 6). Nach Beendigung der Versuches wurden die Datensätze auf einem externen Datenträger gespeichert und zusätzlich auf CD-ROM gesichert.

3.8. Auswertung, Berechnung und statistische Bearbeitung

3.8.1. Datensatzerstellung

Die gewonnenen primären Versuchsdaten wurden zunächst mit einem selbst entwickelten Computerprogramm überarbeitet. Dazu wurde der komplette Datensatz eines Versuchstieres mit allen Versuchszyklen in den Speicher des Computers geladen. Die experimentellen Bezugswerte, die einzelnen Versuchsphasenabschnitte sowie Artefakte wurden markiert, nach einem Syntax deklariert und abgespeichert. Für die spätere Berechnung der Relativwerte der einzelnen Parameter wurde der 0 Wert (z_0) unter totaler Abklemmung bzw. nach Ende des Versuches und der jeweilige Ausgangswert als 1 vor dem jeweiligen Eingriff definiert. Während des Versuches entstandene Artefakte, zum Beispiel Druckspitzen des renalen Perfusionsdrucks (RPP), die beim Freispülen des Katheters nach Verschluss durch einen Thrombus entstanden, wurden markiert und eliminiert. Die markierten und deklarierten Versuchsphasen wurden anschließend auf der Festplatte und zusätzlich auf CD-ROM gespeichert.

3.8.2. Auswertung und statistische Bearbeitung der Rampen

3.8.2.1. Bestimmung der absoluten und relativen Leitwerte

Mit einem weiteren Computerprogramm wurden die Mittelwerte sowie der mittlere Fehler des Mittelwertes der Absolutwerte für die einzelnen Versuchsparameter berechnet, das heißt, es entstanden für jeden Parameter die Graphen der mittleren Absolutwerte und der dazugehörige mittlere Fehler. Analog erfolgte die Bestimmung der mittleren Relativwerte. Es entstanden zweidimensionale Datensätze für die Versuchsparameter jedes Tieres, die in 2 mmHg Schritten für jeden einzelnen Parameter (LFC, LFM, RBF, RPP) abgespeichert wurden und bei der späteren Verarbeitung als Abszisse dienten.

Im Anschluss erfolgte die Berechnung der absoluten sowie relativen Leitwerte für jede Versuchsphase und alle Versuchsparameter jedes Versuchstieres nach der Formel:

$$\begin{aligned} \text{LFC} &= \text{LFC}_{\text{absolut}}(\text{AU}) - \text{LFC}_{\text{absolut}}(\text{AU}) \text{ bei } z_0 \\ \text{LFM} &= \text{LFM}_{\text{absolut}}(\text{AU}) - \text{LFM}_{\text{absolut}}(\text{AU}) \text{ bei } z_0 \\ \text{rel. LFC} &= \text{LFC} / \text{LFC Ausgangswert} \\ \text{rel. LFM} &= \text{LFM} / \text{LFM Ausgangswert} \\ \text{Leitwert RBF} &= \text{RBF} / \text{RPP} \\ \text{rel. Leitwert} &= \text{Leitwert} / \text{Ausgangsleitwert} \\ \text{rel. RPP} &= \text{RPP} / \text{Ausgangswert RPP} \\ \text{rel. Leitwert LFM} &= \text{rel. LFM} / \text{rel. RPP} \\ \text{rel. Leitwert LFC} &= \text{rel. LFC} / \text{rel. RPP} \\ \text{rel. Leitwert RBF} &= \text{Leitwert RBF} / \text{Ausgangsleitwert RBF} \end{aligned}$$

RBF: renaler Blutfluss [ml/min]; RPP: renaler Perfusionsdruck [mmHg];
LFC und LFM : Laserfluss cortical und medullär [AU = arbitrary units]
 z_0 : Werte von LFC u. LFM bei lokaler Abklemmung; rel.: renal; rel.: relativ ; abs.: absolut

Die berechneten Leitwerte wurden zusammengefasst und gemittelt, die mittlere Streuung berechnet und graphisch über den mittleren Perfusionsdruck dargestellt.

3.8.2.2. Charakterisierung der RBF-Autoregulation über die Maximalwertbestimmung des relativen renalen Leitwertes

Eine Autoregulation eines elastischen Gefäßsystems liegt mit Sicherheit dann vor, wenn es bei einem Abfall des renalen Blutflusses (RBF) zu einem Anstieg des renalen Leitwertes kommt. Ein starres Rohrsystem hat unter gleichen Bedingungen hingegen immer einen relativen Leitwert von

1. Bei einem passiv elastischen Rohr würde der Leitwert mit dem Druck sinken. Renale Mechanismen, wie z.B. der myogene Mechanismus, TGF und der metabolisch gesteuerte Mechanismus [64] sind daran erkennbar, dass bei sinkendem Perfusionsdruck (RPP) der relative Leitwert größer als 1 ist.

Um eine Aussage über die Effektivität der renale Autoregulation treffen zu können, wurden die Maximalwerte der relativen renalen Leitwerte bei Drucksenkung bzw. Erhöhung gewählt. Dazu wurden für jeden Versuchsparameter, Versuchsphase und Versuchstier das Maximum des relativen renalen Leitwertes und der dazugehörige Rampendruck durch das Programm bestimmt, markiert und abgespeichert.

3.8.3. Auswertung der Sprungantworten

Eine schnelle Erhöhung des renalen Perfusionsdruckes (RPP), durch Desufflation der periaortalen Manschette, führt zu einem Anstieg aller Flüsse. Der Drucksprung fungiert hier als Eingangssignal für die Niere, während der renale Blutfluss das Ausgangssignal als eine Resultierende darstellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Autoregulation der Niere durch einen myogenen Mechanismus, den Tubuloglomerulären Feedback (TGF) und möglicherweise einen metabolischen Mechanismus reguliert wird [64]. Aus diesem Grund wird die renale Autoregulation als Gesamtsystem betrachtet, bestehend aus drei parallelen Teilsystemen (RBF-Autoregulationsmechanismen), die das gleiche Eingangssignal (u_e) erhalten und deren Ausgangssignale (u_a) sich zu einer resultierenden Sprungantwort überlagert. Die gemessenen Flusssignale steigen nach Desufflation des Manschette exponentiell an, bis sie sich einem stabilen Endwert annähern. Sie werden meist durch sichtbare Schwingungen überlagert. Aus diesem Grund wurde, wie der Vergleich mit technischen Systemen zeigt, als Grundelement ein Verzögerungsglied 2. Ordnung (PT_2) für das Verhalten jedes einzelnen Mechanismus gewählt.

Die Sprungantwort des PT_2 Gliedes folgt immer der Funktion :

$$u_a = u_e k (1 - e^{-\delta t} \cos(\omega t + \varphi)) \quad (1)$$

u_a	Ausgangssignal (RBF)	δ	Dämpfung
u_e	Eingangssignal (RPP)	ω	Kreisfrequenz
k	Übertragungsfaktor	φ	Phasenwinkel
t	Zeit		

Diese Funktion hat zum Zeitpunkt Null den Wert Null und geht exponentiell in einen stabilen Endwert über, der dem Wert vor der Abklemmung entspricht. Der Übertragungsfaktor k ergibt sich als Quotient u_a/u_e nach Einstellung des stabilen Endzustandes. Die Werte von ω und δ bestimmen den Zeitverlauf dieses Übergangs. Wenn $\omega > \delta$ ist, bedeutet dies, dass zusätzlich Schwingungen überlagert sind, für $\omega \leq \delta$ erfolgt der Übergang aperiodisch. Im Falle von drei parallel arbeitenden RBF-Autoregulationsmechanismen ergibt sich das Ausgangssignal als Summe der Ausgangssignale der einzelnen Mechanismen.

$$u_a = u_e k \sum_{i=1...3} (1 - A_i e^{-\delta_i t} \cos(\omega_i t + \varphi_i)) \quad (2)$$

U_a und u_e liegen als Messgrößen vor. Das Ziel besteht darin, die unbekanntes Phasenwinkel φ_i , Kreisfrequenzen ω_i , Dämpfungswerte δ_i und Amplituden A_i durch Näherungsverfahren zu bestimmen, so dass die Summe der Abweichungsquadrate minimal wird.

Bei drei angenommenen Schwingungen sind zwölf Parameter entsprechend der obigen Gleichung zu bestimmen. Dies geschah mit Hilfe von drei aufeinander folgenden Näherungsverfahren für jeweils eine Schwingung. Die Differenz zwischen gemessener Sprungantwort und berechneter Modellkurve, das Residuum, war der Ausgangspunkt für eine erneute Approximation. Auf diese Weise ließ sich eine immer bessere Annäherung der berechneten an die gemessenen Kurven realisieren. Abbildung 8 zeigt dies an einem Beispiel. Diese Sprungantwort stammt aus Untersuchungen an Ratten nach Gabe von L-NAME. Diese Messergebnisse waren der Ausgangspunkt für die Entwicklung des Verfahrens zur Auswertung der Sprungantworten. Der Zeitverlauf der Sprungantworten variiert von Tier zu Tier und bei unterschiedlichen Versuchbedingungen. Es ist keineswegs so, dass die Schwingung mit der höchsten Frequenz bzw. kleinsten Schwingungsdauer wie in Abbildung 8 immer das Ergebnis der ersten Näherung darstellt. Andererseits sind die Ergebnisse von Fitverfahren von der Wahl der Startwerte der unbekanntes Parameter abhängig. Deshalb wurde folgendes Verfahren gewählt. Für die Größe ω wurden sechs verschiedene Startwerte von $\omega = 0,03 \text{ s}^{-1}$ ($T = 209 \text{ s}$) bis $\omega = 0,96 \text{ s}^{-1}$ ($T = 6,5 \text{ s}$), drei verschiedene Dämpfungswerte $\delta = \omega/10$ (schwach gedämpfte Schwingung), $\delta = \omega/2$ (stark gedämpfte Schwingung) und $\delta = \omega * 2$ (aperiodischer Übergang)

gewählt. Die Werte der Kreisfrequenzstartwerte überstreichen den aus der Literatur bekannten Schwingungsdauerbereich von 10 s bis 100 s [64].

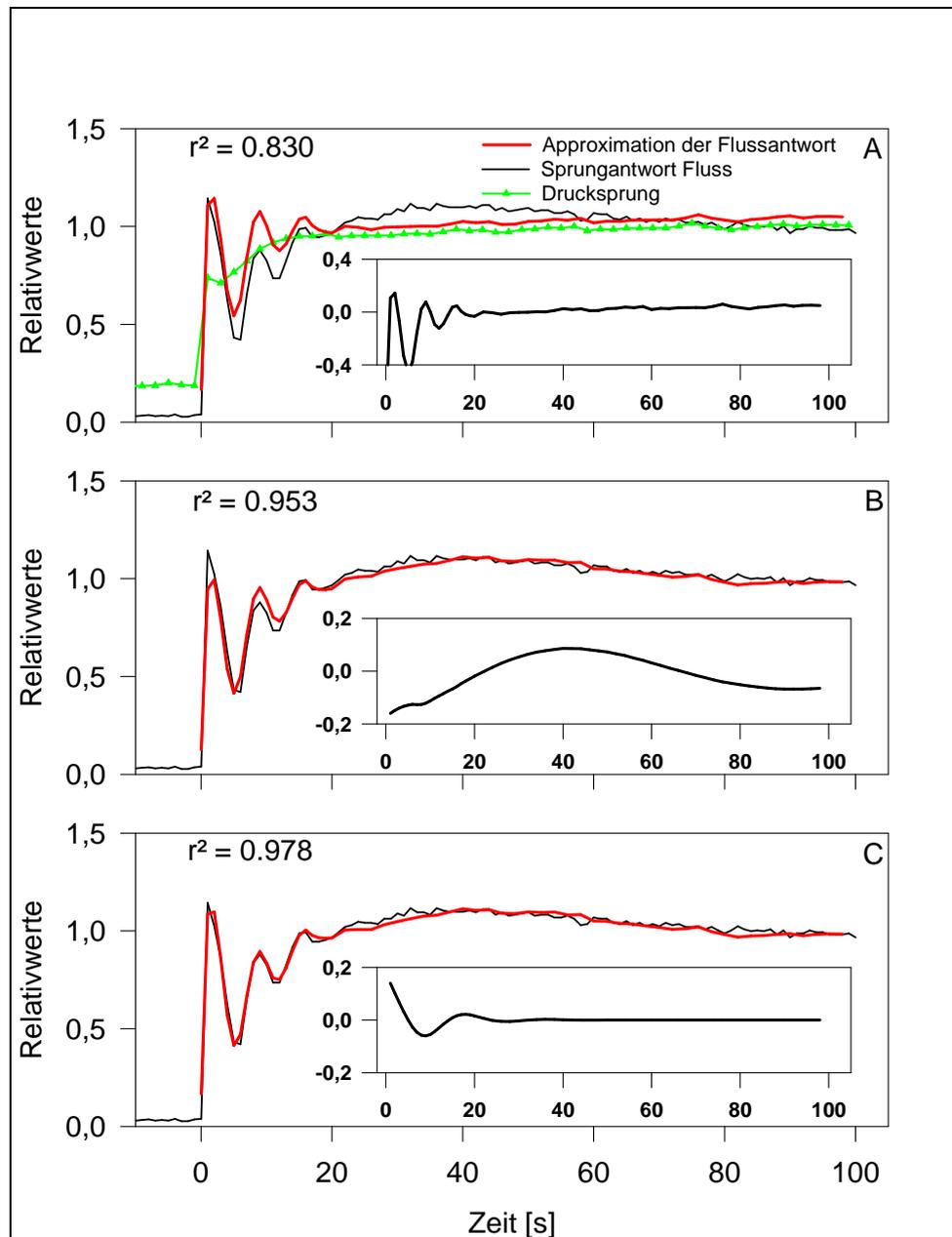


Abbildung 8

Originalregistrierung der Relativwerte des Druckes (grüne Kurve in A) und des renalen Blutflusses (schwarze dünne Registrierung in A, B, C) nach Aufhebung einer Abklemmung der Aorta aus [142].

Die Startwerte für die Amplituden (A_i) wurden direkt den Messkurven entnommen. Für jede Kurvenapproximation wurde das Fitverfahren mit 18 verschiedenen Startwertkombinationen durchlaufen. Die beste Annäherung, d.h. die mit der kleinsten Summe der Abweichungsquadrate, nach dem Ansatz aus Gleichung 2 wurde als verbindliches Ergebnis gespeichert. Die eingesetzten kleinen Diagramme zeigen die isolierte durch Näherung berechnete Schwingung.

Die roten Darstellungen sind das Ergebnis dreier aufeinander folgender Fitprozeduren. Die berechneten Parameter wurden in Gleichung 2 eingesetzt und der Zeitverlauf berechnet. Dies ergab die Approximationen der Sprungantwort, die in Abbildung 8 A, B, und C zu sehen sind. Einsetzen der berechneten Parameter in den Schwingungsanteil ($A_i e^{-\delta_i t} \cos(\omega_i t + \varphi_i)$) von (2) lieferte die in den kleinen Grafiken dargestellten gedämpften Schwingungen. Das Bestimmtheitsmaß r^2 zwischen berechneter und gemessener Kurve charakterisiert die Güte der Näherung.

Die Amplituden sowie Schwingungsdauern wurden für jedes einzelne Versuchstier berechnet. Es wurde dabei von Relativkurven ausgegangen, wobei eine Amplitude mit dem Wert von Null keiner Amplitude entsprach. Anschließend erfolgte die graphische Darstellung der Amplituden der Relativwerte über der Schwingungsdauer. Als Beispiel ist hier die Verteilung der Schwingungsdauern des renalen Blutflusses der transgenen ET-1 Versuchsgruppe unter Ausgangsbedingungen mit entsprechender Amplitudenhöhe in der Abbildung 9 exemplarisch dargestellt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem unter 3.8.4. angeführten Schema.

Zusätzlich zu der beschriebenen Analyse der Sprungantworten erfolgte eine Bestimmung der Zeitkonstante der Sprungantworten. Die Zeitkonstante entspricht der Zeit die vergeht, bis nach dem Einschalten eine Größe 63,2% des Endwertes erreicht wird. Die Bestimmung der Zeitkonstante erlaubt eine grobe Einschätzung des Zeitverhaltens eines Systems. Die Existenz oder der Wegfall eines Regulationsmechanismus beeinflusst die Zeitkonstante, dieser kann jedoch nicht unmittelbar daraus abgelesen werden.

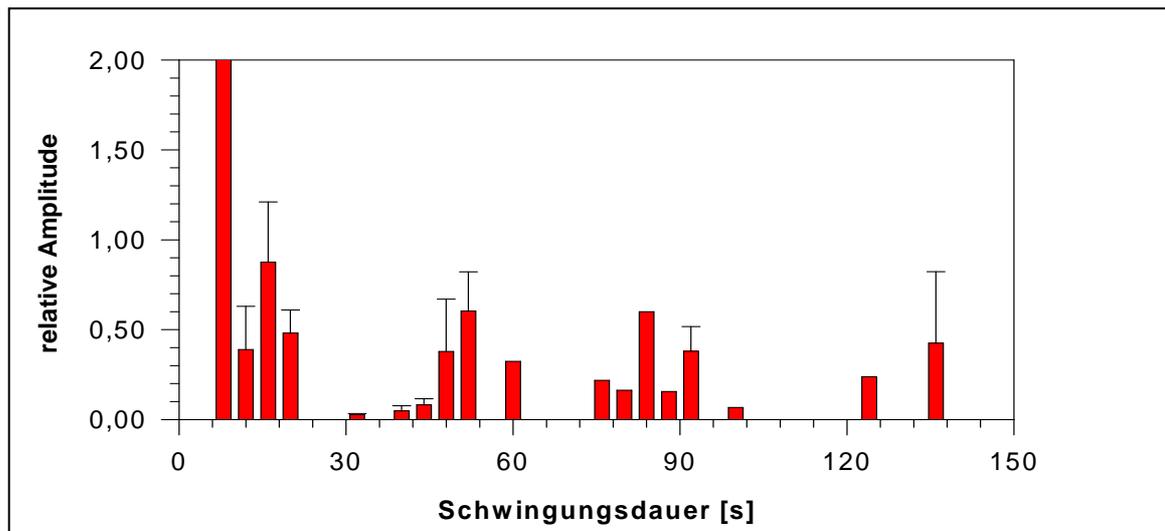


Abbildung 9 Amplitudenverteilung in Abhängigkeit von der Schwingungsdauer des RBF bei ET-1 überexprimierenden Mäusen unter Ausgangsbedingungen (Mittelwerte \pm SEM).

3.8.4. Statistik

Die in den Abbildungen dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten und deren mittlerer Fehler (= Standardabweichung / \sqrt{n}). Die Untersuchungen der Änderungen der absoluten und relativen renalen Leitwerte der Versuchsparameter aller Versuchsphasen, die Maximalwertänderungen sowie die Amplitudenänderungen unter differenten Ausgangslagen der Mausstämmen untereinander und gegeneinander wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests für unabhängige Stichproben auf ihre Signifikanz geprüft. Bei mehreren zeitlich zusammenhängenden Beobachtungen wurde der Friedman Test benutzt. Für die Signifikanzprüfung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gefordert. Die Graphische Darstellung aller Diagramme erfolgte mit dem Anwenderprogramm Sigma Plot 7.0 (SPSS, Chicaco, IL).