

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

##### **3.1.1 Geräte**

Mikrotom, Fa. Leitz, Deutschland

Stoffwechselfäfige für Ratten, Fa. Ehret, Deutschland

Zentrifuge Biofuge 13, Fa. Heraeus, Deutschland

Modular Analysegerät, Fa. Hitachi Power Tools Europe, Deutschland

Axiovert Mikroskop, Fa. Zeiss, Deutschland

Power Macintosh 7500/100, Fa. Apple Macintosh, USA

BH 2 Mikroskop, Fa. Olympus, Deutschland

Nichtinvasives Blutdruckmessgerät, Life Science Industries, California, USA

All Solid State Camera KP-140, Fa. Hitachi Power Tools Europe, Deutschland

### **3.1.2 Chemikalien**

A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor-Antagonist SLV320, Solvay Pharmaceuticals,  
Hannover, Deutschland

Rompun (Xylazin), Fa. Bayer, Deutschland

Ketavet (Ketamin), Fa. Pharmacia, Deutschland

Standarddiät 1320, Haltungsdiet für Ratten und Mäuse, Fa. Altromin, Deutschland

Festchemikalien, Feinchemikalien und Lösungen der Firmen Merck, Roth, Sigma, Chroma-  
Gesellschaft, Deutschland, J.T. Baker, Holland

Sirius Red, BDH Laboratory Supplies Poole, England

Pikrinsäure, Fa. Riedel-de Haën Laborchemikalien, Seelze, Deutschland

Resorcin-Fuchsin, Chroma-Gesellschaft, Deutschland

Roti-Histokitt, Fa. Sigma, Deutschland

### 3.1.3 Der Wirkstoff SLV320

Bei dem Wirkstoff SLV320 handelt es sich um einen selektiven A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptor-Antagonisten. Seine hohe Rezeptorselektivität für A<sub>1</sub>-Adenosinrezeptoren zeigt sich an seiner niedrigen Inhibitionskonstante (K<sub>i</sub> [nM]); diese bezeichnet die Menge an Wirkstoff, die gebraucht wird um 50% der Rezeptoraktivität zu hemmen.

	SLV320 K <sub>i</sub> [nM]
A <sub>1</sub> -Adenosinrezeptor	1
A <sub>2a</sub> -Adenosinrezeptor	398
A <sub>2b</sub> -Adenosinrezeptor	3981
A <sub>3</sub> -Adeonsinrezeptor	200

Tabelle 1: K<sub>i</sub>[nM] für SLV320

SLV320 wird eine diuretische Wirkung zugeschrieben. Es gilt als neuartiges Diuretikum für Patienten mit verminderter Herz- und/oder Nierenfunktion, die gegenüber anderen üblichen Medikamenten resistent sind.

Der Wirkstoff befindet sich in Phase II der klinischen Studien ([http://www.solvay-investors.com/static/wma/pdf/4/3/4/0/051004solvay\\_pharmaceuticals.pdf](http://www.solvay-investors.com/static/wma/pdf/4/3/4/0/051004solvay_pharmaceuticals.pdf)).

### 3.2 Tiere und Tierhaltung

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 3 Wochen und mit einem durchschnittlichen Gewicht von 55g von der Firma Charles River Deutschland GmbH bezogen. Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Anzeigenummer G 0264/01).

Die Haltung erfolgte mit je 3 Tieren pro Käfig auf StandardEinstreu für Labortiere in normierten Makrolonkäfigen der Größe IV mit Hochdeckeln. Die Stallungen unterlagen einem Lichtregime mit je 12 Stunden künstlichem Licht ab 6.00 Uhr morgens und Dunkelheit ab 18.00 Uhr abends. Die Raumtemperatur betrug 20(±1)°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 (±5) %.

Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt und deren Aufnahme regelmäßig kontrolliert. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Alleinfuttermittel zur Haltung von Ratten und Mäusen.

Für die Gruppen, die den Wirkstoff SLV320 erhalten sollten, wurde das Futter in Pulverform bestellt und der Wirkstoff in der entsprechenden Menge (Dosis 10mg/kg KGW) in das angefeuchtete Pulver gemischt. Anschließend wurde der Brei zu Pellets gerollt und getrocknet.

### **3.3 Studiendesign**

Nach der Ankunft wurde den Tieren eine Eingewöhnungsphase von 7 Tagen bei gleicher Fütterung gewährt. Dann wurden der 1. Stoffwechselfersuch ohne Blutentnahme und die erste Blutdruckmessung durchgeführt. Danach wurden die Tiere zufällig in 4 Gruppen aufgeteilt:

- Sham + Placebo
- Sham + SLV320
- 5/6 Nephrektomie + Placebo
- 5/6 Nephrektomie + SLV320

Im Alter von 5 Wochen wurde die erste Operation durchgeführt (genauere Beschreibung siehe unten) und genau 14 Tage später die zweite. Dann begann Woche 1 von insgesamt 12 Versuchswochen. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit der Fütterung mit dem untergemischten Wirkstoff für die entsprechenden Gruppen begonnen.

Alle 2 Wochen wurden die Tiere gewogen und in den Wochen 1, 4, 6, 9 und 12 wurde der systolische Blutdruck gemessen. Am Ende von Woche 12 wurde der 2. Stoffwechselfersuch mit Blutentnahme durchgeführt.

Noch in derselben Narkose erfolgte die Tötung durch Blutentzug. Das Herz wurde entnommen, durch einen Querschnitt halbiert und die Herzspitze für patho-histologische Untersuchungen in Formalin fixiert.

### **3.4 Physiologische Methoden**

#### **3.4.1 Operationsmethode**

Männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 5 Wochen und mit Körpergewichten zwischen 120 und 140g wurden mit Xylazin (2mg/kg) und Ketamin (40mg/kg) via intraperitonealer Applikation narkotisiert.

Die 5/6-Nephrektomie wurde wie von Gretz et al. 1988 beschrieben durchgeführt. Das Operationsfeld wurde rasiert und desinfiziert. Der Zugang erfolgte über die rechte bzw. linke Flanke. In der ersten Operation wurde die rechte Niere dekapsuliert und die beiden Nierenpole mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial ligiert, so dass 2/3 der Niere abgebunden waren. Der Zugang wurde mit Vicryl 4/0 (Fa. Ethicon, Deutschland) verschlossen. In der zweiten Operation, die zwei Wochen später durchgeführt wurde, wurde die linke Niere komplett entfernt und die zu- und abführenden Gefäße ligiert. Der Wundverschluss erfolgte auch hier mit Vicryl. Bei den Kontrolltieren wurde die jeweilige Niere lediglich dekapsuliert und die Wunde wieder verschlossen.

#### **3.4.2 Blutdruckmessung**

Mit Hilfe eines automatischen, nicht-invasiven Messsystems wurden der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt.

Diese Methode wird als „Tail-Cuff-Methode“ bezeichnet und erfolgt nicht-invasiv am wachen Tier unter Verwendung einer Druckmanschette und eines integrierten optischen Pulsaufnehmers.

Für diese Messungen werden die Tiere einzeln in spezielle Plexiglasröhren (Restrainer) verbracht und dann in eine Wärmebox überführt, in der eine konstante Temperatur von 38°C herrscht. Dies dient der Hyperämisierung der zu untersuchenden Schwanzarterie. Die Tiere wurden an drei aufeinander folgenden Tagen im Restrainer mit angelegter Druckmanschette antrainiert um stressbedingte Artefakte zu minimieren.

Der Druck am Schwanz wird durch aufblasen der Druckmanschette erzeugt. Die Manschette besteht aus einem kurzen Kunststoffrohr, an dem eine Gummimembran mit zwei O-Ringen befestigt wird. Ein Schlauch stellt die Verbindung zu dem im Steuerteil integrierten Druckgenerator her, der die Manschette schrittweise (5mmHg/sec) aufbläst. Druckanstieg und -abfall werden durch den Mikroprozessor gesteuert. Durch die kontinuierliche Druckerhöhung wird eine arterielle Okklusion erreicht. Ist die Arterie vollständig verschlossen, so erkennt der Pulssensor keine Pulsation mehr. Anschließend wird der Druck in der Manschette langsam wieder abgelassen. In demjenigen Moment, in dem die

Pulswelle nach der Okklusion erstmals wieder einsetzt, wird der aktuelle Druck auf der Manschette als systolischer Blutdruck registriert.

Für die Pulssignalerkennung ist ein optischer Pulsaufnehmer in die Druckmanschette integriert. Kernstück dieses Pulsaufnehmers ist eine hochempfindliche Infrarot-Leuchtdiodenkombination (Opto-Sensor), die den Lichtdurchgang durch den Schwanz misst. Die durch Blutdruckschwankungen verursachten Änderungen im Durchmesser der arteriellen Gefäße führen letztendlich zu einer veränderten Lichtdurchlässigkeit, die vom Opto-Sensor registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Nach elektronischer Verstärkung und Filterung steht dieses Signal zur Anzeige und Auswertung zur Verfügung (Pulskurve). Die Herzfrequenz (in Schlägen pro Minute, SPM) wird kontinuierlich aus dem Pulssignal durch Mittelwertbildung errechnet.

### **3.4.3 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig**

#### **3.4.3.1 Versuchsdurchführung**

Vor Versuchsbeginn werden die Körpergewichte der Ratten bestimmt. Dann werden die Tiere mit einer definierten Menge Wasser und Futter ad libitum für 24 Stunden im Stoffwechselkäfig belassen. Nach Ablauf dieser Zeit werden die aufgenommene Wassermenge und die Menge des abgesetzten Urins protokolliert. Der Urin wird anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Dies wurde mit allen Tieren sowohl vor der ersten Operation als auch am Ende von Woche 12 unmittelbar vor der Tötung durchgeführt.

Nach dem Stoffwechselversuch in Woche 12 wurden die Tiere mit Ketamin und Xylazin narkotisiert und Blut durch Punktion der Vena cava gewonnen, welches in Lithium-Heparin beschichtete Röhrchen überführt und sofort gekühlt wurde. Innerhalb von zwei Stunden wurde das Blut zentrifugiert und das so gewonnene Plasma bis zur Analyse bei einer Temperatur von -20 Grad aufbewahrt.

Das Plasma wurde mit Hilfe eines klinisch-chemischen Autoanalysers (Hitachi Modular) untersucht. Der quantitative Nachweis von Kreatinin, Harnstoff, AST, ALT, Na, K erfolgte photometrisch im Automaten.

Die Urinuntersuchung (quantitative Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff, Totalprotein, Albumin) wurde ebenfalls im Autoanalyser (Hitachi Modular) durchgeführt.

### **3.4.3.2 Berechnung**

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist das Volumen des Glomerulumfiltrats pro Zeiteinheit. Die GFR ist der Quotient aus Kreatinin im Urin ( $U_K$ ) und Kreatinin im Plasma ( $P_K$ ) multipliziert mit dem Urinfluss ( $U_{vol}$ ) in ml/min.

$$GFR = U_K \times U_{vol} / P_K$$

Die Proteinurie bzw. Albuminurie in mg/24h errechnet sich aus gemessenem TP bzw. Albumin in mg/ml im Urin multipliziert mit dem in 24 Stunden abgesetzten Urinvolumen in ml.

### **3.4.4 Organentnahme**

Nach Tötung der Tiere durch Blutentzug wurde das Herz entnommen und gewogen. Danach wurde das Herz durch einen Querschnitt halbiert und die Herzspitze sofort in 4%igem Formalin fixiert.

## **3.5 Histologische Methoden**

### **3.5.1 Fixierung**

Prinzip:

Durch die Fixierung der Organe werden das Auftreten postmortaler Veränderungen und eine Herauslösung von Zellbestandteilen während histochemischer Reaktionen verhindert. Dies wird durch Fällung der Zellproteine und eine Stabilisierung von Fetten und Lipiden erreicht.

Die Herzspitze wurde in 4%igem phosphatgepuffertem Formaldehyd für die Einbettung in Paraffin fixiert.

Formaldehyd (HCHO) führt zur Bildung von Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine, was eine Blockade dieser Aminogruppen zur Folge hat.

Es kommt zu einer Vernetzung der Eiweiße.

### **3.5.2 Paraffineinbettung mit einer Histokinette**

Die formalinfixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 1h entwässert (70%iges, 80%iges, 2x96%iges, 3x absolutes Ethanol) und dann für zweimal 4h in Xylol überführt.

Danach wurden die Präparate für 1h in reines geschmolzenes Paraffin bei 56°C gegeben und für 2 h in ein weiteres Paraffinbad überführt.

Diese Schritte wurden über Nacht automatisch in einer Histokinette durchgeführt.

Am folgenden Tag wurden die Organe in TissueTek Unikassetten mit 56°C warmem Paraffin übergossen. Nach dem Erkalten waren die Präparate schnittfähig und es wurden am Mikrotom 4µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

### 3.5.3 Sirius-Red-Färbung

Prinzip:

Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff, der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt.

Chemikalien:

- gesättigte wässrige Pikrinsäure: - 40g Pikrinsäure mit 1l heißem Wasser ansetzen
  - 30g Pikrinsäure mit 1l kaltem Wasser ansetzen
  - mischen, vor Gebrauch filtrieren
- Sirius-Red-Lösung 0,1%: - 0,1g Sirius-Red-Farbstoff in 100ml Pikrinsäure lösen
  - filtrieren, ph-Wert auf 2,0 einstellen
- HCl 0,01 N
- Xylol 100%
- Ethanol 70, 80, 96, 100%

Färbeprotokoll:

- 2 mal 5 min Xylol zum Entparaffinieren
- absteigende Alkoholreihe zum Entwässern: 100, 96, 80, 70% Ethanol jeweils 5 min
- Aqua dest. 5 min spülen
- 60 min Sirius-Red-Lösung
- HCl kurz eintauchen
- aufsteigende Alkoholreihe: 70, 80, 96, 100% jeweils 5 min
- 2 mal 5 min Xylol
- eindecken mit Histokitt

Färbeergebnis:

Kollagenfasern werden rot-violett angefärbt, der Hintergrund gelb

### 3.5.4 Elastica-Färbung

Prinzip:

Elastomuzin bildet die Hüllschicht elastischer Fasern in den Gefäßwänden und reagiert stark sauer. Der hier verwendete Farbstoff Resorcin-Fuchsin ist basisch und wird an diese Hüllschicht polar gebunden, so dass sich die Elastica in den Gefäßwänden dunkelvioletts darstellt, während das umliegende Gewebe nicht angefärbt wird.



Chemikalien:

-Resorcin-Fuchsin

-HCl-Alkohol 1%ig

-Xylol 100%

-Ethanol 100, 96, 80, 70%

Färbeprotokoll:

- 2 mal 5 min in Xylol zum Entparaffinieren

- absteigende Alkoholreihe zum Entwässern: 100%, 96%, 80% Ethanol jeweils 2 min

- 5 min Resorcin-Fuchsin

- mit Aqua dest. spülen

- 30 sec HCl-Alkohol 1%ig zum Differenzieren, danach Mikroskopkontrolle

- 10 min mit fließendem Leitungswasser spülen

- mit Aqua dest. spülen

- aufsteigende Alkoholreihe: 70, 80% Ethanol kurz spülen, 96, 100% jeweils 2 min

- 2 mal 5 min Xylol

- eindecken mit Roti-Histokitt

Färbeergebnis:

Die Elastica der Arterien färbt sich dunkelviolett an, der Hintergrund ist nicht angefärbt.

### **3.6 Auswertung**

#### **3.6.1 Interstitielle Fibrose**

Die Auswertung der Sirius Red gefärbten Schnitte zur Quantifizierung der interstitiellen Fibrose erfolgte an einem Power Macintosh 7500/100 mit dem Programm Image in der Version 1.61 (Shareware des National Institute of Health, NIH, USA).

Zur morphometrischen Analyse wurden die histologischen Präparate mit einem Zeiss-Axiovert-Mikroskop und einer Hitachi-KP-140-Kamera bei 40facher Vergrößerung in den Rechner eingelesen. Aus 9 Einzelbildern der Kamera wird vom Programm Image ein Durchschnittsbild errechnet. Dies dient der Minimierung von kamerabedingten Artefakten. Zur Bestimmung des Anteils an kollagener Matrix pro Bildausschnitt wird im Treshold-Modus eine Schwarz/Weißgrenze (zwischen 0 und 255, bei 256 Graustufen) festgelegt, bei der die zu messenden Flächen schwarz zur Geltung kommen. Das Programm Image ermöglicht es, Partikel in einem bestimmten Größenbereich unter der Angabe der minimalen und der maximalen Fläche, zu zählen. An jedem Präparat wurden 20 zufällig ausgewählte Ausschnitte vermessen. Alle Präparate der zu vergleichenden Gruppen wurden mit derselben Schwarz/Weißgrenze gemessen.

### 3.6.2 Media-Lumen-Ratio

Die Ermittlung der Media-Lumen-Ratio wurde am Power Macintosh mit dem Programm Image in der Version 1.61 an Elastica-gefärbten Schnitten durchgeführt.

Hierzu werden Bildausschnitte aus den histologischen Präparaten, in denen sich quer angeschnittene Arterien befinden, mit dem Zeiss-Axiovert-Mikroskop aufgesucht und mit der Hitachi-KP-140-Kamera bei 40facher Vergrößerung in den Rechner eingelesen. Dann wird mit der Maus erst die innere Begrenzung der Media (Lumen) nachgezeichnet und die Größe des so umfahrenen Bereiches gespeichert. Dann wird die äußere Begrenzung der Media mit dem Stift nachgezeichnet und die Größe des Bereiches zwischen den beiden gezeichneten Linien (Media) errechnet und gespeichert. Um das Verhältnis von Media zu Lumen zu erhalten, wird der Quotient gebildet aus Media und Lumen.

### 3.6.3 Perivaskuläre Fibrose

Die Ermittlung der perivaskulären Fibrose erfolgte mit einem Scoring-System am Olympus BH 2 Mikroskop bei 40facher Vergrößerung an Sirius-Red gefärbten Schnitten.

Es werden 5 Scoring-Gruppen benannt, die die Menge an perivaskulärem Bindegewebe im Verhältnis zur Breite der Media in Prozent wiedergeben:

Gruppe 1: 0-25%

Gruppe 2: 25-50%

Gruppe 3: 50-75%

Gruppe 4: 75-100%

Gruppe 5: >100%

Es werden quer angeschnittene Arterien im Schnitt aufgesucht, bewertet und einer Gruppe zugeordnet. Anschließend wird gezählt, wie viele Gefäße zu jeweils welcher Gruppe gehören und nach folgender Formel ein Index für die perivaskuläre Fibrose jedes Schnittes errechnet.

$$(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E) = F$$

A = Anzahl der zu Gruppe 1 gehörenden Gefäße

B = Anzahl der zu Gruppe 2 gehörenden Gefäße

C = Anzahl der zu Gruppe 3 gehörenden Gefäße

D = Anzahl der zu Gruppe 4 gehörenden Gefäße

E = Anzahl der zu Gruppe 5 gehörenden Gefäße

Index = F / Summe der pro Schnitt in die Auswertung eingegangenen Gefäße

### 3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Programms SPSS für Windows® in der Version 11.5. Anhand des *Mann-Whitney-U-Tests* wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermittelt. Hierbei handelt es sich um einen nichtparametrischen Test, der dem T-Test entspricht, jedoch keine Normalverteilung innerhalb der Stichproben voraussetzt. Der Test bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei Gruppen derselben Grundgesamtheit entstammen. Als signifikant unterschiedlich bewertet wurden Ergebnisse mit einem p-Wert von kleiner oder gleich 0,05.

Für die Balken- und Liniendiagramme wurden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Gruppen verwendet.

Alle in den Tabellen angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte mit SEM.