

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturstudien

2.1.1 Anlegen von Gefäßmuskelzellkulturen

Die nachfolgend dargestellten Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsdatum: 12.10.01, Registriernummer: 0245/01). Für die Zellkulturexperimente wurden 14 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von sechs Wochen verwendet. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis an Pentobarbital (150 mg/kg KGW) getötet. Sofort danach wurde die Aorta thoracica unter sterilen Bedingungen entnommen und in einer Petrischale platziert, die Nährmedium (DMEM, Gibco BRL) mit einem Zusatz an Penicillin (100 U/ml, Gibco BRL), Streptomycin (100 µg/ml, Gibco BRL), fetalem Rinderserum (10%, Gibco BRL) und Pferdeserum (5%, Gibco BRL) enthielt. Anschließend wurde die Aorta mit Hilfe zweier Pinzetten von Blut und Bindegewebe gereinigt und mit einer Federschere in Längsrichtung aufgeschnitten. Mittels eines sterilen Wattetupfers erfolgte durch Reiben an der Gefäßinnenwand die Entfernung des Endothels. In einer zweiten mit Nährmedium gefüllten Petrischale wurde die Aorta mit der Federschere zerkleinert. Die Stücke wurden im Anschluss zusammen mit dem Medium in gelatinebeschichtete Objektträgerkammern (Lab-Tek™, Nunc, Wiesbaden) hineinpipettiert und in einen Brutschrank gestellt, in dem eine Temperatur von 37°C und eine CO₂-Konzentration von 5% herrschte. Nach fünf bis sechs Tagen waren die Primärkulturen zu 40% - 60% konfluent (Abbildung 2.1). In diesem Stadium wurden sie für die Transfektionsexperimente verwendet.

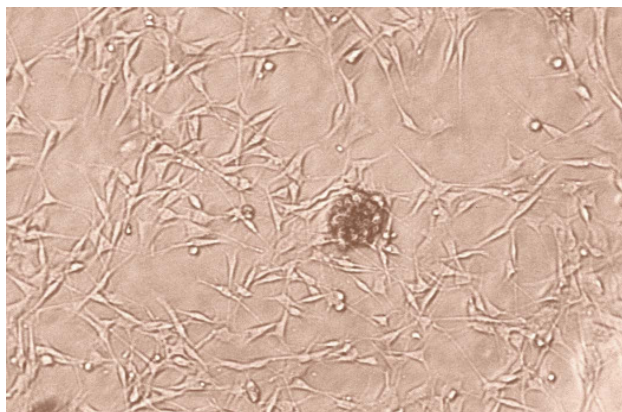


Abbildung 2.1: Primärkultur aortaler Gefäßmuskelzellen einer Sprague-Dawley-Ratte, dargestellt mit einem invertierten Mikroskop (Axiovert S 100, Zeiss) bei 16-facher Vergrößerung. Die Zellen sind zu 40-60% konfluent. In der Mitte der Abbildung ist ein Gewebestückchen zu sehen, aus dem Zellen herauswachsen.

2.1.2 Immunzytochemische Charakterisierung der glatten Gefäßmuskelzellen

Die kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen wurden immunzytochemisch mit Hilfe von Antikörpern gegen glattemuskelspezifisches α -Aktin (α -sm) typisiert. Dazu wurden die Zellkulturen direkt nach der Entnahme aus dem Inkubator zweimal in phosphatgepufferter Lösung (PBS, Gibco BRL) gewaschen und anschließend 15 Minuten lang in 3%-iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift in PBS/ 0,1% Triton X-100 wurden die Zellen eine Stunde lang in 5% Ziegen-Normalserum (Calbiochem) in PBS/ 0,1% Triton X-100/ 1% BSA/ 3 mmol/l EGTA (Sigma) präinkubiert, worauf sich ein 16-stündiger Inkubationsschritt mit dem monoklonalen anti- α -sm-Primärantikörper (Maus IgG2a, Klon 1A4, A 2547, 1:400 in PBS) bei 4°C anschloss. Danach folgte eine 1,5-stündige Inkubation mit einem Zweitantikörper (Ziege anti-Maus IgG, Rhodamin-Konjugat; Calbiochem; 1:200) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach jeder Antikörperbehandlung folgten jeweils drei Waschschriffe von 15 Minuten in PBS/ 0,1% Triton X-100/ 1% BSA/ 3mM EGTA. Bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Auszählung zeigten fast 95% der Zellen eine intensive Aktin-Anfärbbarkeit. Für die Negativkontrollen wurden die Primärantikörper durch Ziegen-Normalserum ersetzt. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch keine Färbung festgestellt werden, was darauf hinweist, dass der Sekundärantikörper nicht unspezifisch an zelluläre Strukturen bindet. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Einbettmedium (VECTASHIELD, Alexis Deutschland GmbH), das DAPI zur Darstellung der Zellkerne enthielt, eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt. In Abbildung 2.2 ist eine α -Aktin-positive Zelle dargestellt.

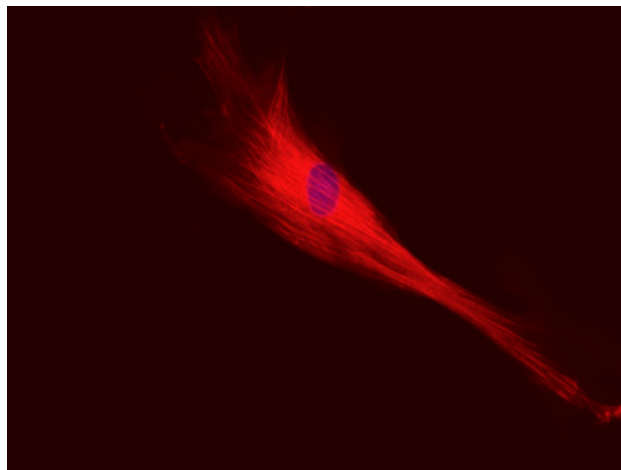


Abbildung 2.2: α -Aktin-Färbung einer Gefäßmuskelzelle aus der Aorta einer Sprague-Dawley-Ratte, dargestellt bei 40-facher Vergrößerung. Als Primärantikörper wurde ein Maus IgG2a, Klon 1A4 (Sigma), als Sekundärantikörper ein Ziege anti-Maus IgG, Rhodamin-Konjugat (Calbiochem) eingesetzt. Die DAPI-Färbung (blau) diente der Darstellung von Zellkernen.

2.1.3 Transfektionsexperimente an glatten Gefäßmuskelzellen

Die Plasmide, die die entsprechende α_1 -Adrenozeptor-Subtyp-DNA enthielten, wurden uns freundlicherweise von Prof. R. J. Lefkowitz, Duke University, Howard Hughes Medical Institute, Durham, NC, USA zur Verfügung gestellt. Im Einzelnen waren dies pBC12BI $\alpha_{1A/C}$ (α_{1A} , Rind)⁹⁰, pBC12BI α_{1B} (α_{1B} , Hamster)⁸⁹ und pCMV5 α_1 RA42 (α_{1D} , Ratte)⁹¹. Das p-EGFP-C1-Expressionsplasmid wurde von CLONTECH, Heidelberg, Deutschland bezogen. Es enthält ein Gen, das für ein grünes fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Dieses Protein diente als Marker für erfolgreich transfizierte Zellen.

Nach der Etablierung eines Transfektionsprotokolls unter Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen der Transfektionsmedien DMRIE-C (Gibco BRL), Lipofectamine (Gibco BRL), Cellfectin (Gibco BRL) und Kalziumphosphat (Sigma) zeigte das im Folgenden beschriebene Protokoll unter Verwendung von DMRIE-C die höchste Transfektionseffizienz. Diese betrug, gemessen am Anteil der GFP-positiven Zellen, knapp 10%.

Zu Beginn des Protokolls wurden je 300 ml Nährmedium (DMEM), ohne Zusatz an Serum, in vier Kammern einer 24-Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden in jede der vier Öffnungen je 10 μ l des lipophilen DMRIE-C-Transfektionsreagenz hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden den vier Kammern jeweils 300 μ l einer serumfreien, 3,3 μ g DNA enthaltenden, Plasmid-DMEM-Lösung hinzugefügt. Um die Wahrscheinlichkeit dafür zu erhöhen, dass eine GFP exprimierende Zelle gleichzeitig das α_1 -Adrenozeptor-Plasmid enthielt, wurde das Rezeptorplasmid im Überschuss dazugegeben. Daher setzten sich die 3,3 μ g DNA aus 0,3 μ g des p-EGFP-C1-Plasmids und aus 3,0 μ g des jeweiligen α_1 -Adrenozeptor-Plasmids zusammen. Auch die Kontrollgruppe wurde mit dem p-EGFP-C1-Plasmid transfiziert, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Auswirkungen der Transfektionsreagenzien bzw. des GFP auf das Experiment vorzubeugen. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen, die sich in Lab Tek Chamber Slide Systems (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) befanden, einmal mit serumfreiem DMEM gewaschen, das anschließend durch 200 μ l des Lipid-DNA-Komplexes ersetzt wurde. Im Anschluss erfolgte eine sechsstündige Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Um die Wirkung des Transfektionsreagenz aufzuheben, wurden die Zellen anschließend mit serumhaltigem DMEM gewaschen. In diesem wurden sie für weitere 36 Stunden im Brutschrank belassen. Am Tag des experimentellen Einsatzes wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss) auf GFP-Fluoreszenz untersucht und bei positivem Befund für die immunzytochemischen und funktionellen Studien verwendet.

Das folgende Protokoll beschreibt die Vorgänge bei der Immunfärbung von Gefäßmuskelzellen unter Verwendung des α_1 -Adrenozeptor-Antikörpers ohne Subtypselektivität (Alexis Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland). Die Zellkulturen wurden direkt nach der Entnahme aus dem Inkubator zweimal in phosphatgepufferter Lösung (PBS, Gibco BRL) gewaschen und anschließend 15 Minuten lang in Paraformaldehydlösung (3%, Sigma) bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS mit einem Zusatz an 0,1% Triton X-100 (Sigma), das der Permeabilisierung der Zellen diente, um eine Interaktion zwischen dem verwendeten Antikörper und der intrazellulär liegenden Rezeptorsequenz zu ermöglichen, erfolgte eine einstündige Inkubation in PBS mit einem Zusatz an 0,1% Triton X-100, 1% BSA und 10% Ziegen-Normalserum. Dieser Schritt diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurden die Zellen mit einem polyklonalen α_1 -Adrenozeptor-spezifischen Primärantikörper ohne Subtypselektivität (1:1000, Alexis Biochemicals) 16 Stunden lang bei 4°C, sowie danach mit einem sekundären Alexa 594-Konjugat (1:200, Ziege anti-Kaninchen, Molecular Probes) über 1,5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation folgten jeweils drei Waschschriffe von 15 Minuten in PBS/ 0,1% Triton X-100/ 1% BSA. Am Ende wurden die Zellen in Einbettmedium mit DAPI-Zusatz (VECTASHIELD, Alexis Deutschland GmbH) eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Für die Immunfärbungen mit den drei subtypselektiven α_1 -Adrenozeptor-Antikörpern (1:200, Ziege, Santa Cruz Biotechnology) wurde ebenfalls das eben beschriebene Protokoll verwendet, mit dem Unterschied, dass für die Präinkubation Kaninchenserum und als Zweitantikörper ein Texas Red-Konjugat (1:500, Kaninchen anti-Ziege, Acris) verwendet wurde. Sowohl Texas Red als auch Alexa 594 haben ihre Exzitations- und Emissionsmaxima im roten Bereich des Lichtspektrums, wodurch sie nicht mit den GFP-Maxima, die im grünen Bereich liegen, interferieren.

2.1.5 Bestimmung der Leuchtdichte mittels der konfokalen Lasermikroskopie

Die Transfektionsrate ist bei Kulturen glatter Gefäßmuskelzellen gering, was ihren Einsatz in Gentransfer-Experimenten erschwert. Eine weitere Herausforderung stellt die selektive Bestimmung membrangebundener, für den Kontraktionsprozess entscheidender, α_1 -Adrenozeptoren dar, die auch in anderen Zellkompartimenten nachzuweisen sind^{95;129}. Aus diesem Grund haben wir uns für die konfokalmikroskopische Darstellung, der mit spezifischen Antikörpern angefärbten Zellen entschieden. Als Maß für die Rezeptorexpression wurde die Leuchtdichte der Zellbegrenzung bestimmt. Die Darstellung der Zellen erfolgte mittels eines konfokalen Lasermikroskops TCS 4 DVV, Leica bei 40-facher Vergrößerung (Ölimmersionsobjektiv, PL FLUOTAR

40x/1.00-0.50 OIL, Zeiss). Die Texas Red- und die Alexa 594-Fluoreszenz wurde durch einen 568-Argon-Krypton-Laser angeregt und bei einer Wellenlänge unter 690 nm aufgenommen.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Mikroskopeinstellungen während der Experimente nicht verändert. Außerdem wurden nur Zellen eines Objektträgers miteinander verglichen, die dem selben Färbeprotokoll unterzogen worden waren. Aufgrund möglicher Unterschiede in der Bindungsspezifität der subtypeselektiven Antikörper wurde kein quantitativer Vergleich der Expression unterschiedlicher Subtypen durchgeführt. Durch den Einsatz eines α_1 -Adrenozeptor-Antikörpers mit fehlender Subtypeselektivität konnte jedoch ein Vergleich der Gesamtexpression an α_1 -Adrenozeptoren in transfizierten und nichttransfizierten Zellen durchgeführt werden. Die Bilder wurden als 8-Bit-Tiff-Dateien abgespeichert (Abbildung 2.4) und zur weiteren Analyse auf einen PC übertragen. Die Bestimmung der Leuchtdichte der Zellgrenzen erfolgte mit Hilfe der Bildanalysesoftware (NIH ImageJ, Version 1.32e). Dabei wurde für jede Zelle an zehn zufällig ausgewählten Stellen entlang der Zellbegrenzung die Leuchtdichte in jeweils einem kleinen rechteckigen Areal konstanter Größe bestimmt. Aus den zehn Werten wurde anschließend der Mittelwert gebildet.

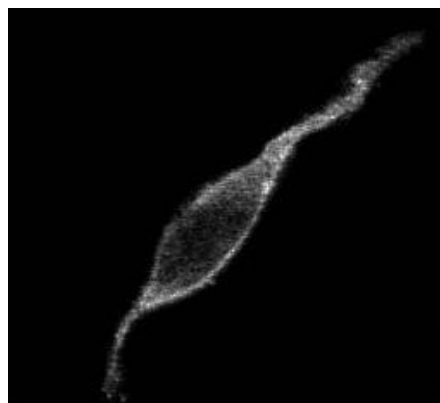


Abbildung 2.4: Isolierte Gefäßmuskelzelle aus der Aorta einer Sprague-Dawley-Ratte. Die Zelle wurde mit dem α_{1B} -Adrenozeptor transfiziert und mit einem α_1 -Adrenozeptor-Antikörper ohne Subtypeselektivität (Kaninchen) sowie einem Alexa 594-Konjugat (Ziege anti-Kaninchen, Molecular Probes) angefärbt. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (TCS 4 DVV, Leica) bei 40-facher Vergrößerung.

2.1.6 Funktionelle Studien an glatten Gefäßmuskelzellen

Für die funktionellen Experimente wurden die Zellkulturen auf dem Heiztisch eines invertierten Mikroskops (Axiovert S 100, Zeiss) platziert. Die in diesen Studien verwendeten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch selektiert. Dabei fanden nur GFP-positive, spindelförmige Zellen experimentellen Einsatz. Über eine auf dem Mikroskop montierte Kamera wurden sie auf einem Monitor dargestellt. Mit Hilfe des Programms ATI-Player (ATI Technologies Inc., Markham, Ontario, Kanada) wurde von jeder fokussierten Zelle, bei 40-facher Vergrößerung, eine Videosequenz mit einer Abtastrate von 2 Hz aufgenommen. Nach einer Filmvorlaufzeit von jeweils 10 Sekunden wurde die entsprechende Zelle mit 100 mmol/l KCl bzw. mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} mol/l) des α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin stimuliert und ihre entsprechende Reaktion aufgenommen. Nach jeder Applikation wurde die Lösung mehrmals ausgetauscht, um das KCl bzw. das Phenylephrin vollständig zu entfernen. Dies war notwendig, um die Zellen zwischen den verschiedenen Dosisapplikationen wieder in ihren Ausgangszustand zu überführen. Nur so war eine Bestimmung der Kontraktionsgeschwindigkeit für jede Einzeldosis möglich. Die funktionellen Experimente wurden in oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung folgender ionaler Zusammensetzung (mmol/l) bei 37 °C durchgeführt: NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 und Glukose 11.

Die Auswertung der Videosequenzen mit den Zellkontraktionen erfolgte mittels der Bildanalysesoftware Khoros (Khoral Research, Inc., Albuquerque, NM, USA). Dabei wurde eine virtuelle Linie durch den am stärksten kontrahierenden Zellbereich gelegt. Die Analysesoftware ermöglichte es, den Zeitverlauf der Kontraktion entlang der virtuellen Linie zu bestimmen und als ASCII-Datei abzuspeichern. Für die Bestimmung des Kontraktionsausmaßes und der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit wurde die resultierende Kontraktionskurve an folgende Antwortfunktion angepasst:

$$\delta(t) = B + \frac{C - B}{1 + e^{-\frac{t-t_{50}}{\tau}}}$$

In dieser Funktion beschreibt $\delta(t)$ die Änderung des Zelldurchmessers über die Zeit. Der Parameter B repräsentiert den Ausgangsdurchmesser, C entspricht dem Durchmesser im maximal kontrahierten Zustand, t_{50} repräsentiert den Zeitpunkt an dem 50% der maximalen Kontraktion erreicht sind und τ entspricht der Zeitkonstante, die die Kontraktionsgeschwindigkeit bestimmt. Die Änderungen des Zelldurchmessers wurden in Prozent des Ausgangsdurchmessers ausgedrückt ($100 \cdot (B-C)/B$). Die Kontraktionsgeschwindigkeit wurde als prozentuale Änderung des

Ausgangsdurchmessers pro Sekunde angegeben. Dazu wurde die angepasste Funktion normalisiert, so dass der basale Zelldurchmesser (B) 100% entsprach (Abbildung 2.5). Das Maximum der ersten Ableitung dieser normalisierten Funktion entsprach der Kontraktionsgeschwindigkeit.

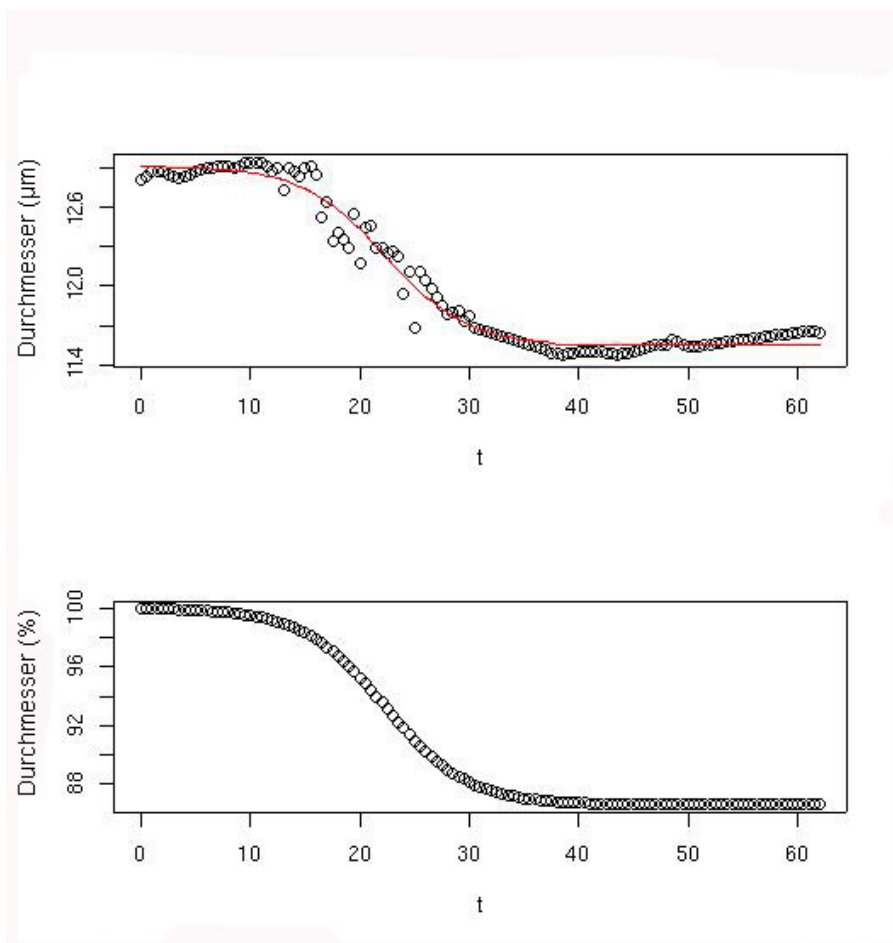


Abbildung 2.5: Darstellung des Kontraktionsverlaufes einer Gefäßmuskelzelle aus der Aorta einer Sprague-Dawley-Ratte infolge der Applikation von 10^{-4} mol/l Phenylephrin. Die obere Kontraktionskurve stellt den zeitlichen Verlauf der absoluten Durchmesseränderung dar. Dabei ist auf der Ordinate der Zelldurchmesser in μm abgetragen, auf der Abszisse hingegen die Zeit. Die untere, an die sigmoidale Antwortfunktion angepasste Kurve, gibt die prozentuale Änderung des Durchmessers an. Hier ist der Durchmesser auf der Ordinate relativ angegeben, wobei der Ausgangsdurchmesser 100% entspricht.

2.2 Systemphysiologische Untersuchungen am wachen Tier

Alle im Folgenden genannten Versuche wurden entsprechend der Richtlinien der American Physiological Society (APS) im Zeitraum von Oktober 2002 bis April 2003 an der University of Iowa, Iowa City, IA, USA durchgeführt und im Vorfeld von dem Iowa Animal Care and Use Committee (IACUC) genehmigt.

2.2.1 Tierstämme

Die systemphysiologischen Versuche wurden an spontan hypertensiven Ratten (SHR, n=8), deren normotensivem Kontrollstamm Wistar Kyoto (WKY, n=8) sowie an hypertensiven 2-Kidney-1-Clip-WKY-Ratten (2K-1C, n=10) durchgeführt. Für den Erhalt von 2K-1C wurden normotensive WKY-Ratten vier Wochen vor ihrem experimentellen Einsatz operativ mit einem silbernen, lumenverengenden Nierenarterienclip von 0,2 mm Innendurchmesser versehen. Alle Tiere wurden von Charles River, Wilmington, MA, USA bezogen und waren zum Zeitpunkt der Experimente 12-14 Wochen alt. Das mittlere Gewicht der Ratten betrug bei experimentellem Einsatz $266,3 \pm 13,5$ g (SHR), $253,3 \pm 16,3$ g (WKY) sowie $247,1 \pm 11,9$ g (2K-1C) und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Für alle Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

2.2.2 Tierhaltung

Alle Tiere wurden in der Animal Care Unit der University of Iowa, Iowa City, IA, USA von Tierpflegern und Tierärzten bis kurz vor dem Versuch betreut. Sie wurden in Plastik Käfigen unter kontrollierten Umweltbedingungen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden gehalten. Im Drahtdeckel der Käfige waren Futterraufe mit handelsüblichem Standardfutter in pelletierter Form sowie eine Trinkflasche mit Wasser zur freien Verfügung der Tiere untergebracht. Am Morgen der operativen Implantation der Gefäßkatheter und der Nervenlektrode wurde die entsprechende Ratte einzeln in einen Käfig gesetzt und ins Labor gebracht. Nach der Operation kam das Versuchstier in den selben Käfig zurück, wo es 24 Stunden Zeit zur Erholung bei freiem Zugang zu Wasser und Futter hatte.

2.2.3 Herstellung geeigneter Gefäßkatheter

Für die in dieser Studie verwendeten Ratten wurden geeignete Katheter für die hämodynamischen Messungen selbst hergestellt. Als Kathetermaterial wurde Polythene Tubing in drei verschiedenen Größen:

#1 Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm (Ref. 800/110/100),

#2 Innendurchmesser 0,40 mm, Außendurchmesser 0,80 mm (Ref. 800/110/140),

#3 Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,96 mm (Ref. 800/110/200),

der Firma Portex Limited, Hythe, Kent, England verwendet.

Der arterielle Katheter wurde aus zwei Stücken von #1 und #3 hergestellt. Für die Herstellung des venösen Katheters wurde lediglich Material #2 verwendet. Um eine bessere Übertragung des Blutdrucksignals zu erreichen und um den Druckabfall im Katheter so gering wie möglich zu halten, musste ein ca. 4 cm langer Abschnitt von Kathetermaterial #1 an ein ca. 40 cm langes Stück von Kathetermaterial #3 geschweißt werden. Dazu wurden beide sauber abgetrennten Katheterstücke unter einem Stereomikroskop auf einen Draht gefädelt, so dass sich deren beiden Enden direkt berührten. Anschließend wurden beide Stücke unter Verwendung eines LötKolbens geschmolzen und gleichzeitig mit einer Drehbewegung aufeinander zugeschoben. Damit erreichte man die Verschmelzung beider Enden unter Beibehaltung eines durchgängigen Lumens. An den dickeren Teil des Katheters wurde nun eine Kanüle einer mit isotoner Natriumchloridlösung gefüllten Spritze zur Spülung des Katheters aufgesetzt. War die Verbindung beider Teilstücke regelrecht, konnte man die Lösung mit leichtem Druck durch den Katheter spülen, ohne dass Flüssigkeit aus der Schweißstelle austrat.

2.2.4 Implantation der Gefäßkatheter und der Nervenlektrode

Am Tag der Operation wurden die Tiere gewogen, eine entsprechende Menge an Ketaminlösung in einer Spritze aufgezogen und eine Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht (KGW) intraperitoneal injiziert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums der Narkose wurde die Haut im Bereich der rechten Leiste, der linken Flanke sowie des Nackens rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde das Tier auf einem Operationstisch in Rückenlage fixiert. Durch Palpation der Leiste wurde die Stelle für den Hautschnitt aufgesucht, und die Haut mit einer Schere ca. 1 cm eröffnet. Bei dem Blick durch das Operationsmikroskop (Leica MZ6) zeigten sich von lateral nach medial der Nervus femoralis, die Arteria femoralis und die Vena femoralis. Unter Schonung des Nerven

wurden Arterie und Vene durch vorsichtige Präparation mittels zweier Pinzetten freigelegt und stumpf voneinander getrennt, wobei besonders auf die leichte Verletzbarkeit der Vene und kleinerer Gefäßabgänge geachtet werden musste.

Die Arterie wurde zur temporären Unterbindung des Blutstromes mit einem Faden (Ethibond 4/0, Ethicon Inc., Somerville, NJ, USA) distal ligiert und proximal unterschlungen. Anschließend wurde sie mittels einer Federschere (Aesculap OC498R) in der Mitte zwischen den beiden Haltefäden im spitzen Winkel angeschnitten und der Katheter konnte mit einer Pinzette (Inox 5) in das Lumen der Arterie eingeführt und vorsichtig bis zum Schweißpunkt am Katheter vorgeschoben werden. Mit heparinisierte Kochsalzlösung (25000 I.E. Heparin/l) wurde der Katheter auf seine Durchgängigkeit überprüft. Die korrekte intraarterielle Lage des Katheters konnte am Pulsieren der Blutsäule im Katheter beurteilt werden. Dieser wurde dann mit beiden Fäden an der Arterie fixiert.

Die Vene wurde zuerst proximal aufgespannt und dann distal ligiert. Die venöse Katheterimplantation verlief analog zur Implantation des arteriellen Katheters. Anschließend wurde das Tier in Bauchlage gebracht und ein Hautschnitt am Nacken durchgeführt. Eine Arterienklemme wurde durch den Nackenschnitt subkutan bis zur Leistenregion vorgeschoben und mit ihr beide Katheter am distalen Ende gefasst, die Spritze entfernt und das Katheterende subkutan bis in die Nackenregion durchgezogen. Nach erneuter Überprüfung der Katheterdurchgängigkeit wurden die Katheterenden bis auf etwa 3 cm gekürzt, mit einer Flamme (Feuerzeug) verschweißt und farblich markiert (Arterie/rot, Vene/blau). Danach wurde der Schnitt in der Leistenregion genäht (Ethibond 4/0).

Nach der Implantation der Gefäßkatheter erfolgte die Implantation der Nervenelektrode. Dazu wurde die Ratte in Rechtsseitenlage gebracht, und es erfolgte ein etwa 4 cm langer Hautschnitt im Bereich der linken Flanke mit nachfolgender Durchtrennung der darunter liegenden Muskelschichten und Eröffnung des Retroperitonealraumes. Daraufhin wurde der Nervus splanchnicus major aufgesucht und auf die Ableitelektrode gelegt. Die bipolare Elektrode bestand aus zwei kleinen Häkchen aus Silberdraht, die einen Abstand von ca. 2 mm zueinander aufwiesen. Die Nervenpräparation (Nerv und Elektrode) wurde anschließend mit einer kleinen Menge an Silikon gel (Wacker Chemie AG, München, Deutschland), das der elektrischen Isolation diente, umschlossen. Innerhalb von zehn Minuten härtete das Gel zu einer gummiartigen Masse aus.

Die elektrischen Leitungen der Elektrode wurden zusammen mit einer subkutan platzierten Referenzelektrode und den zuvor implantierten Gefäßkathetern im Bereich der Nackenhaut ausge-

führt, die anschließend durch Naht verschlossen wurde. In Abbildung 2.6 ist die Instrumentierung einer Ratte schematisch dargestellt.

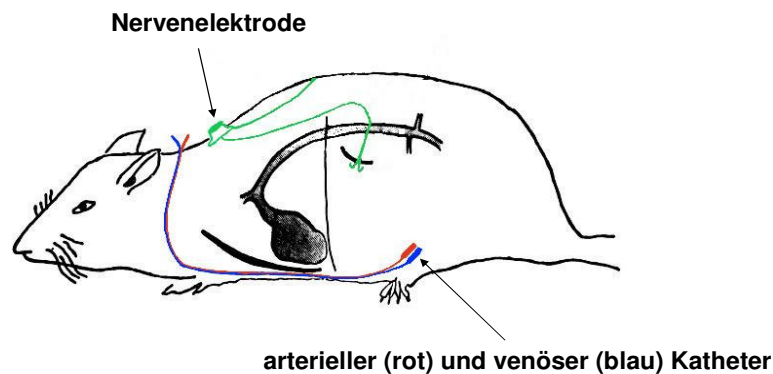


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Instrumentierung eines Versuchstieres. Über den arteriellen Katheter (rot) wurde das Blutdrucksignal abgeleitet. Der venöse Katheter (blau) diente der Applikation gefäßaktiver Substanzen. Über die Nervenlektrode (grün) wurde die sympathische Nervenaktivität des Nervus splanchnicus major abgeleitet.

2.2.5 Aufbau des hämodynamischen Messplatzes

Die Messung des arteriellen Blutdruckes, der Herzfrequenz und der sympathischen Nervenaktivität erfolgte im wachen Zustand. Dies hat den Vorteil, dass ein Einfluss des Narkosemittels auf die Ergebnisse ausgeschlossen wird. Dabei erfolgte die Aufnahme des Blutdrucksignals direkt aus der Arteria femoralis. Dies beinhaltet gegenüber indirekten Methoden der Blutdruckmessung (wie zum Beispiel der Plethysmografie) den besonderen Vorteil einer sehr genauen und hochauflösenden Messung (Abtastrate 500 Hz). Das Katheterende am Nacken der Ratte wurde mittels einer auf beiden Seiten stumpfen Kanüle (24G) mit einem weiteren Polythene-Schlauch (#2) verbunden. Der Schlauch hatte eine Länge von 50 cm und wurde oben aus dem Käfig geführt, wodurch es dem Tier möglich war, sich während des gesamten Experimentes, frei im Käfig zu bewegen. Der Druckwandler (P23ID, Gould, Valley View, OH, USA), der sich auf Herzniveau der Ratte befand, war an einen Brückenverstärker (Series 4600, Gould, Valley View, OH, USA) angeschlossen, dessen Signal mit Hilfe der frei verfügbaren Software XmAD

(<ftp://sunsite.unc.edu/pub/linux/science/lab>) aufgezeichnet werden konnte. Das Blutdrucksignal wurde mit einer Abtastrate von 500 Hz kontinuierlich während des gesamten Experimentes aufgezeichnet. Die Herzfrequenz wurde online aus dem Blutdrucksignal berechnet.

Zur Messung der Nervenaktivität wurde die Nervenelektrode über ein 1 m langes Kabel mit einem Signalverstärker (Grass Instruments, Quincy, MA, USA) verbunden, dessen Signal wie das Blutdrucksignal mit Hilfe der Software XmAD aufgezeichnet werden konnte. In Abbildung 2.7 ist ein fünfminütiger Ausschnitt einer Aufzeichnung des Blutdruckes, der Herzfrequenz und der Nervenaktivität dargestellt.

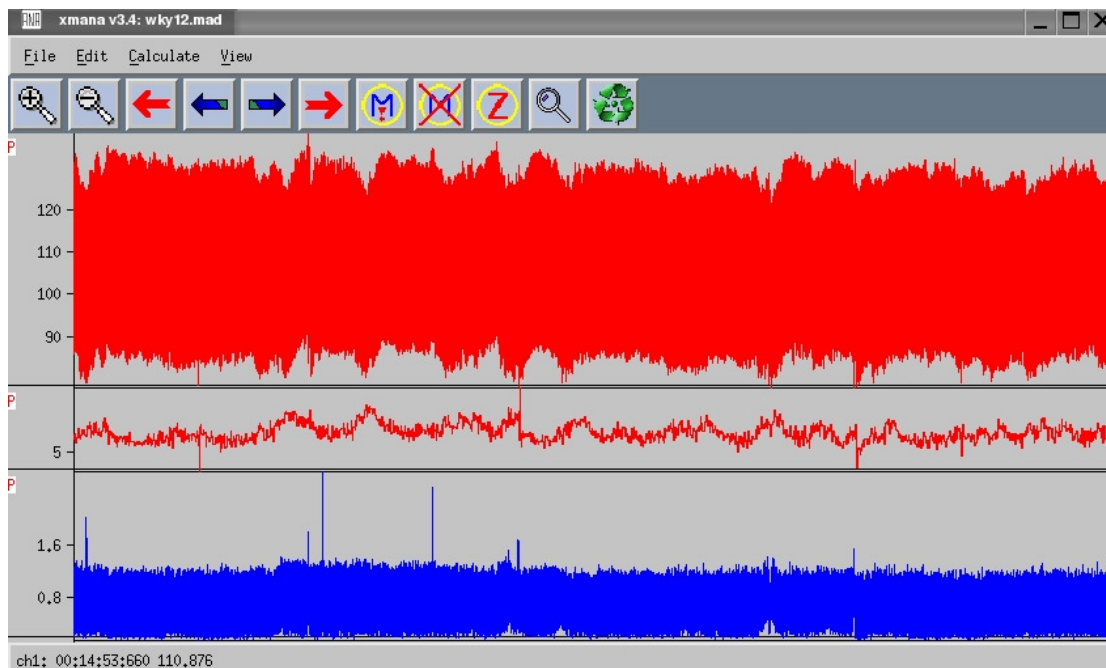


Abbildung 2.7: Fünfminütiger Ausschnitt einer Aufzeichnung des Blutdruckes (oberer Kanal, in mmHg), der Herzfrequenz (mittlerer Kanal, in Hz) und der sympathischen Nervenaktivität (unterer Kanal, in μV) mit Hilfe der Software XmAD.

2.2.6 Analyse der Leistungsspektren

Aus den mit einer Abtastfrequenz von 500 Hz digitalisierten Blutdruckzeitreihen wurde der mittlere Blutdruck für jeden Herzschlag berechnet. Diese diskontinuierliche Zeitreihe des mittleren Blutdruckes wurde mittels einer kubischen Spline-Funktion interpoliert und mit 500 Hz abgetastet. Die Leistungsspektralanalyse der nun äquidistanten Zeitreihen der Blutdruckwerte sowie der ebenfalls mit 500 Hz Abtastung vorliegenden Nervenaktivität erfolgte mittels schneller Fourier-Transformation. Dabei wurden Abschnitte aus jeweils 65536 Werten (131 s, Frequenzauflösung = 0.0076 Hz) und 50% Überlappung mit einer Gesamtdauer von 45 Minuten analysiert. Die Spektren der überlappenden Segmente wurden gemittelt und in relativen Einheiten, bezogen auf

die Maximalleistung im Spektrum, dargestellt. Die spektrale Leistung im Hoch- (0,6-2,5 Hz), Mittel- (0,2-0,6 Hz) und Niederfrequenzbereich (0,02-0,2 Hz) entsprach der Fläche unter der Kurve dieser Frequenzbereiche. Sie wurde als relativer Wert (% der Summe der Leistung von hoch-, mittel- und niederfrequentem Bereich) angegeben.

2.2.7 Funktionelle Studien am wachen Tier

Die in vivo-Studien wurden einen Tag nach der Implantation der Gefäßkatheter und der Nerven-elektrode an acht SHR, acht WKY- sowie zehn 2K-1C-Ratten durchgeführt. Ausschlaggebend für die relativ kurze Zeitspanne zwischen Operation und Experiment war die ziemlich schnell einsetzende Degeneration des mit der Nerven-elektrode versehenen N. splanchnicus major. Diese setzt bei einem Großteil der Ratten bereits am zweiten postoperativen Tag ein und verhindert somit eine zuverlässige Messung des Nervensignals zu diesem Zeitpunkt.

Nach dem Anschluss des arteriellen Katheters und der Nerven-elektrode an die Messinstrumente wurde so lange gewartet bis sich das Tier ruhig verhielt. Danach erfolgte eine Registrierung von Blutdruck, Herzfrequenz und Nervenaktivität über 45 Minuten. Diese Registrierungsperiode diente als Grundlage für die spätere Leistungsspektralanalyse.

Nach der Ruheregistrierung wurden den Tieren mittels einer Mikroliterspritze (Hamilton, Reno, NV, USA) gefäßaktive Substanzen in verschiedenen Dosierungen intravenös verabreicht. Dabei diente Phenylephrin (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW) der Untersuchung der α_1 -adrenergen Blutdruckansprechbarkeit. Um die Änderungen des Blutdruckes gegenüber einem nichtadrenergen Vasokonstriktor zu untersuchen, wurden Experimente unter Verwendung des Vasopressinrezeptor-Agonisten Arginin-Vasopressin (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/kg KGW) durchgeführt. Weiterhin wurde die Blutdruckansprechbarkeit der Tiere gegenüber Natrium-Nitroprussid (0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KGW) getestet, das zu einer endothelunabhängigen NO-vermittelten Relaxation der Blutgefäße führt und somit einen Blutdruckabfall hervorruft. Im Anschluss an die Experimente wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital getötet.

2.3 Studien an isolierten Widerstandsgefäßen

2.3.1 Tiere

Die Versuche an isolierten Widerstandsgefäßen wurden ebenfalls im Rahmen eines von der University of Iowa genehmigten Versuchsvorhabens im Zeitraum von Oktober 2002 bis April 2003 durchgeführt. Wie bei den systemphysiologischen Studien wurden auch bei diesen Experimenten 12-14 Wochen alte, männliche SHR (n=8), WKY (n=8) und 2K-1C (n=8), die unter standardisierten Umweltbedingungen gehalten wurden, verwendet.

2.3.2 Isolierung der Gefäße und Vorbereitung auf das Experiment

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis an Pentobarbital (150 mg/kg KG) getötet. Kurz darauf wurde der Dünndarm samt dem Mesenterium entnommen und in kalter Krebs-Henseleit-Lösung folgender ionaler Zusammensetzung (in mmol/l) gewaschen: NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 und Glukose 11. Anschließend wurde der Darm mit seinem mesenterialen Anteil in einer Petrischale, deren Boden mit Gel (Sylgard, Dow Corning Corp., Midland, USA) ausgekleidet war, ausgebreitet und mittels mehrerer Nadeln am Boden fixiert. Unter einem Operationsmikroskop wurde das mesenteriale Arterienbäumchen mit Hilfe zweier Feinpinzetten sowie einer Federschere freipräpariert. Anschließend wurden die Arterien des dritten Abganges der Arteria mesenterica superior (luminaler Durchmesser: 100-160 µm) entnommen und in einer speziell verkleinerten (5 ml), mit kalter Krebs-Henseleit gefüllten Organkammer (Dept. of Bioengineering, Iowa City, IA, USA) platziert. Das kleine Volumen der Organkammer diente der Verringerung von Diffusionslatenzzeiten, die nach der Applikation vasoaktiver Substanzen in die Kammer auftreten und die einen Einfluss auf die Kontraktionsgeschwindigkeit des Blutgefäßes haben können. Nach der Platzierung in der Organkammer wurde die entsprechende Arterie mit ihren beiden Enden auf zwei sich gegenüberliegenden Glaspipettenspitzen positioniert und mittels zweier 10/0 monofilament Fäden (Ethicon Inc., Somerville, NJ, USA) an den Spitzen fixiert (Abbildung 2.8).

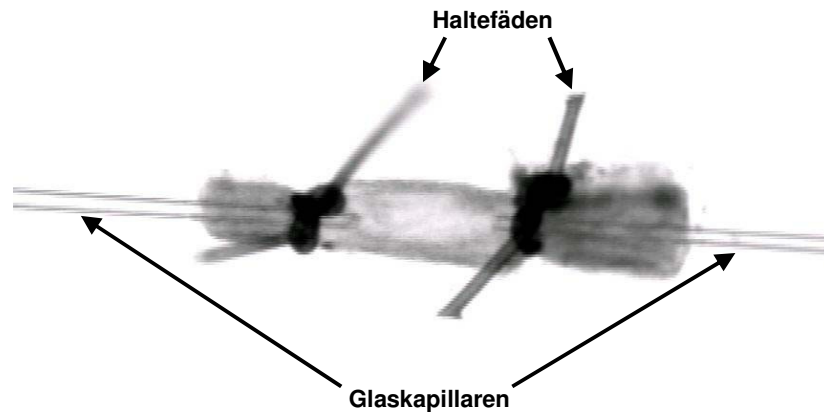


Abbildung 2.8: Mesenteriales Widerstandsgefäß mit einem Innendurchmesser von $120\ \mu\text{m}$, das mit zwei Borosilikatpipettenspitzen kanüliert wurde und dessen Enden mittels eines Monofilamentfadens (10/0) an den Pipettenspitzen fixiert wurden.

Nach Befestigung der Gefäße an den Pipettenspitzen wurde die Organkammer dauerhaft mit einer auf 37°C erwärmten Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert und mit einem Gasgemisch aus 20% O_2 , 5% CO_2 und 75% N_2 begast. Über die Glaspipetten konnte in den Gefäßen ein Druck aufgebaut werden, indem zwei mit den Pipetten in Verbindung stehende Silikonschläuche bis zu einer bestimmten, dem gewünschten Druckniveau entsprechenden Höhe, mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt wurden.

2.3.3 Aufbau des Messplatzes

Die Organkammer mit dem mesenterialen Widerstandsgefäß wurde auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskops (Olympus CK2) befestigt. Auf dem Mikroskop war eine Kamera (GKB, Model NO. CB-3803S) montiert, mit deren Hilfe das Blutgefäß auf einem Monitor vergrößert dargestellt wurde. Mittels eines elektronischen Video Dimension Analyser (Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, USA) wurde der Gefäßdurchmesser an einer ausgewählten Stelle fortlaufend gemessen. In Abbildung 2.9 sind die Elemente des Messplatzes dargestellt.

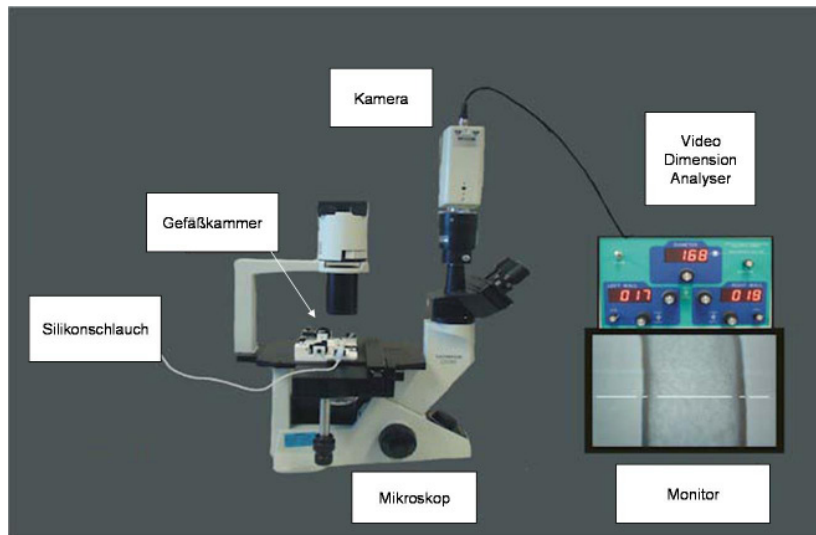


Abbildung 2.9: Elemente des Messplatzes für die Studien an isolierten Widerstandsgefäßen. Auf dem Monitor ist ein Ausschnitt einer vergrößerten, sich in der Organkammer befindenden, kleinen Arterie dargestellt. Die Gefäßwände sind als zwei vertikale dunkle Streifen zu erkennen. Der Gefäßinnendruck wurde über die Höhe der Flüssigkeitssäule im Silikonschlauch eingestellt.

Die Änderung des Gefäßdurchmessers wurde konstant in einem Bereich der Arterie gemessen, der zuvor am stärksten auf die Applikation von 100 mmol/l KCl reagiert hat. In Abbildung 2.10 ist der am stärksten kontrahierende Gefäßbereich durch die weißen Linie markiert.

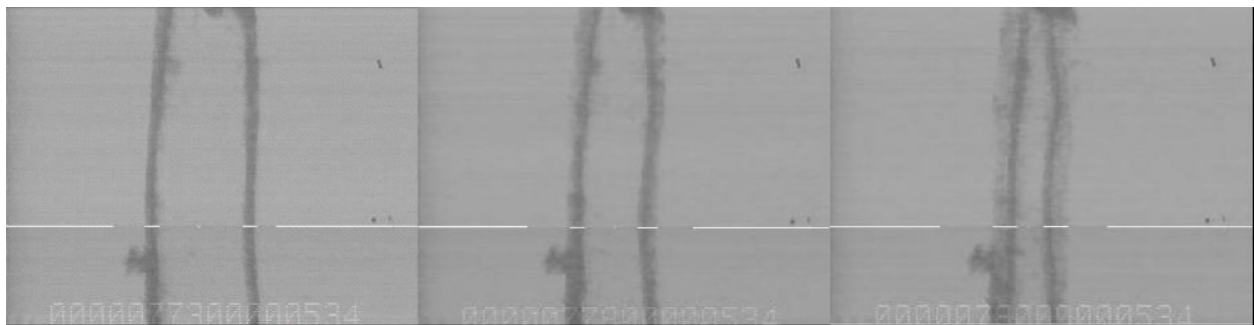


Abbildung 2.10: Etappen der Kontraktion eines isolierten mesenterialen Widerstandsgefäßes einer spontan hypertensiven Ratte (SHR) nach Applikation von 10^{-4} mol/l Phenylephrin. In der linken Abbildung ist das Gefäß vor dem Einsetzen der Kontraktion dargestellt. Die mittlere Abbildung zeigt die gleiche Arterie während der Kontraktion. Rechts ist das Gefäß im maximal kontrahierten Zustand abgebildet. Die Änderung des luminalen Durchmessers wurde entlang der weißen Linie bestimmt.

Das Signal aus dem Video Dimension Analyser wurde mit Hilfe der frei verfügbaren Software XmAD mit einer Abtastrate von 100 Hz auf einem PC aufgezeichnet. Vor jedem Experiment erfolgte eine Kalibrierung des Systems sowie ein Abgleich mit den PC-Einstellungen. Somit konnten die Durchmesseränderungen, wie in Abbildung 2.11 zu sehen, in Form einer Kontraktions-

kurve dargestellt werden. Auf der Ordinate ist der luminale Gefäßdurchmesser, auf der Abszisse die Zeit abgetragen. Diese Kurve wurde ebenfalls an die in Kapitel 2.1.6 beschriebene logistische Antwortfunktion angepasst, wodurch sowohl die relative Durchmesseränderung als auch die relative Kontraktionsgeschwindigkeit ermittelt werden konnte.



Abbildung 2.11: Originalaufzeichnung der Kontraktion eines mesenterialen Widerstandsgefäßes einer spontan hypertensiven Ratte (SHR) nach Applikation von Phenylephrin (10^{-5} mol/l). Auf der Ordinate ist der luminale Durchmesser, auf der Abszisse die Zeit abgetragen. Unmittelbar vor der Kontraktion ist ein Applikationsartefakt in Form einer kleinen Kerbe zu sehen.

2.3.4 Funktionelle Studien

Nach einer Equilibrierungszeit von 60 Minuten wurde für jedes Gefäß der optimale Gefäßinnendruck, bei dem das anschließende Experiment durchgeführt werden sollte, bestimmt. Dies wurde durch die Applikation einer KCl-reichen Krebs-Henseleit-Lösung bei unterschiedlichen Gefäßinnendrücken erreicht. Die resultierende Lösung enthielt dabei eine Konzentration von 100 mmol/l KCl. Diese Konzentration reicht aus, um eine maximale Gefäßkontraktion gegenüber KCl hervorzurufen.

Das Optimum der Gefäßkontraktionen lag bei Druckwerten zwischen 50 und 60 mmHg. Die Gefäßreaktion gegenüber 100 mmol/l KCl wurde außer zur Bestimmung des optimalen Gefäßinnendruckes zur späteren Normierung der Dosis-Wirkungs-Kurven genutzt.

Anschließend wurden Dosis-Wirkungen für den α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin, den α_2 -adrenergen Agonisten Clonidin und den physiologischen sympathischen Transmitter Noradrenalin, der sowohl eine α - wie auch eine β -adrenerge Wirkung ausübt, durch Applikation unterschiedlicher Dosen der entsprechenden Substanz in die Organkammer erstellt. Entsprechend wurden auch die Gefäßreaktionen gegenüber dem nichtadrenergen Agonisten Arginin-Vasopressin untersucht. Um die Kontraktionsgeschwindigkeit für jede Applikationsdosis bestimmen zu können, musste die jeweilige gefäßaktive Substanz nach jeder Verabreichung wieder vollständig ausgewaschen werden. Die Experimente wurden bei Gefäßinnendrüken

2.4 Statistik

Die Angabe der Messwerte erfolgte als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler, wobei n die Anzahl der Ergebnisse repräsentiert. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Auswertung der Experimente mit Hilfe der Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) bzw. bei den Dosis-Wirkungs-Kurven mittels der ANOVA für wiederholte Messungen. An die ANOVA schloss sich bei Erreichen des Signifikanzniveaus ($p < 0,05$) ein Student-Newman-Keuls-Test an. Wenn möglich, wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven zur Ermittlung der Maximalwerte und der Konzentration, die 50% der Maximalreaktion hervorrief (EC_{50}), an eine vierparametrische sigmoidale logistische Funktion angepasst. Die EC_{50} wurde in logarithmierter Form als pEC_{50} angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism für Windows, Version 2.01; GraphPad Inc. San Diego, California, USA verwendet.