

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Lösungen

Lösung	Bestandteil	Mengenangabe
Fixierlösung für Nieren (Methacarn)	Methanol	60 ml
	Chloroform	30 ml
	Eisessig 100 %	10 ml
Fixierlösung für Herzen (Duboscq-Brasil)	Ethanol 80 %	150 ml
	Pikrinsäure	1g
	Formaldehyd 37 %	60 ml
	Essigsäure 100 %	5 ml

Medikamente und Arzneimittel

Artikel	Firma
Ramipril (1mg/kg KG)	Astra-Zeneca
2-Propanol 70 %	Braun
Bepanthen Augensalbe	Roche
Povidon-Iod	Braunol, Braun
Desinfektionsmittel für Instrumente	Braun
S-Ketaminhydrochlorid (0,174mg/100g KG)	Parke-Davis, Ketanest S 25mg/ml
Hautdesinfektionsmittel	Braun
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	Braun
Novalgin	Aventis
Paracetamol-Saft (20mg/kg KG)	Ratiopharm
Xylazin Hydrochlorid (0,065mg/100g KG)	Bayer, Rompun 2 %

Instrumente und Nahtmaterialien

Artikel	Firma
Anatomische Pinzette	Aesculap Standard BD 47/BD 35
Chirurgische Pinzette	Aesculap Standard BD 557

Chirurgische Schere	Aesculap Standard-Modell BC 320
Feine Präparierschere	Aesculap BC 2
Feine Präparierschere	Aesculap Jameson-Werber BC 175
Micro-Pincette Uhrmacher Modell	Aesculap BD 329
Mikro-Nadelhalter	Aesculap Barraquer FD 230
Nadelhalter	Aesculap Crile-Murray BM 219
Wundspreizer	Aesculap Mellinger OA 241
Haken	Werkstatt Lorenz
Nahtmaterial Perma Handseide 0	Sutupak, Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial geflochten 3-0	Dexon II, B. Braun Dexon GmbH
Nahtmaterial Monofilament 6-0	Biosyn, Surgalloy, USSC
Braunülen 20 GA, 16 GA	BD Adsyte Pro
Catheter Transducers Model SPC-330, 3F	Millar, Micro-Tip
Kanülen Gr.1, Gr. 12, Gr. 26	Braun, Sterican
Sterile Einwegspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun
Sterile Einwegspritzen 1ml	Plastipak, Becton Dickinson

Geräte, Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
Kathetersystem	TSE BIOSystems GmbH
Respirator	Rodent Ventilator 7025, UGO Basile
Analysewaage	Satorius Laboratory
Restrainer	Werkstatt der Charité-Berlin, CBF
Blutdruckmessgerät	TSE BIOSystems GmbH
Glasplatte, zugeschnitten, gerader Schliff	Werkstatt d. Charité, CBF
elektrischer Tierhaartrimmer	TCM
Neigungswaage	Bizerba, Sauter KG. Ebingen
Präzisionswaage	Satorius Laboratory
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Glasgefäße mit Schraubverschluss 20ml	Packard, Econo glass vial
Leukosilk 2,5 cm	Bayersdorf

Haltungsfutter für Ratten (Standard)	Altromin
Makrolonkäfige Typ 4	Tecniplast
Messzylinder	Brand Duran
Pipette Reference 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Szintilationsgefäße aus Glas 20 ml	Packard
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Standarttips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Sterile Mullkompressen 5x5 mm	GAZIN, Lohmann
Stickstoff, flüssig	Lager Charité, CBF
Stoffwechselkäfige für Raten	Ehret
Untersuchungshandschuhe M	Kimberly-Clark, Safeskin PFE
Verpackungsfolie	Saran
Wattestäbchen 15 cm	Lohmann Rauscher Inter. GmbH & Co.KG

2.2 Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen, die dieser Studie zugrunde liegen, erstreckten sich über einen Zeitraum von acht Monaten. Innerhalb dieses Untersuchungszeitraumes wurde das durch Vorversuche festgelegte methodische Vorgehen nicht geändert. Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Sie standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin. Unter der Genehmigungsnummer G0093/01 wurden die beschriebenen Tierversuche am 06.07.2001 durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, genehmigt.

2.2.1 Tierstamm und Haltung

Für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden insgesamt 53 männliche MWF-Ratten und 50 männliche Wistar-Ratten als Kontrolltiere verwendet. Der MWF-Rattenstamm wurde 1996 in der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, durch Inzucht etabliert¹²⁵. Die Parenteraltiere für diese Zucht entstammten der Kolonie von MWF/Ztm-Ratten aus dem Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover. Da die kongenitale Oligonephronie der MWF-Ratten geschlechtsspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt ist¹²⁶, wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Männliche Wistar-Ratten wurden gewichtsadaptiert von Charles River, Sulzfeld, bezogen. Die Haltung der Ratten erfolgte in den Räumen der Forschungsanstalt für Experimentelle Medizin (FEM), Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin. Bei freiem Zugang zu Wasser und Standard Rattenfutter (20 % Proteinanteil) lebten maximal sechs Ratten in einem Makrolon-Gemeinschaftskäfig. Die Temperatur in den Haltungs- und Versuchsräumen des FEM betrug durchgehend 20°C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50 %. Ein natürlicher zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine automatisierte Beleuchtungseinrichtung gewährleistet.

2.2.2 Gruppeneinteilung und Studiendurchführung

Im Alter von 12 Wochen wurden insgesamt 53 MWF-Ratten zufällig in drei Gruppen eingeteilt. In Vorversuchen zeigte sich, dass in den Gruppen der subtotal nephrektomierten MWF- wie Wistar-Ratten ein hoher Anteil an Ratten vor Ablauf des Untersuchungszeitraumes verstarb. Um zum Ende der Untersuchungen ungefähr gleichstarke Tiergruppen zu erhalten, erhielten die Gruppen mit nephrektomierten Ratten eine höhere Anzahl an Tieren. So ergeben sich die anfänglich unterschiedlichen Gruppenstärken. Die Einteilung in die entsprechenden Gruppen zeigt Tabelle 2.1. Die Ratten in Gruppe 1 wurden schein-operiert (sham-operiert). MWF-Ratten der zweiten Gruppe unterzog man einer einzeitigen subtotalen Nephrektomie (Nx), wohingegen die Ratten der Gruppe 3 nach erfolgter subtotaler Nephrektomie ab dem Operationstag täglich mit Ramipril, einem Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer), behandelt wurden. Das Medikament erhielten die Ratten in einer Dosierung von 1 mg pro Kilogramm Körpergewicht über das Trinkwasser. Die Ramipril Substitution wurde bis zum Tötungstag am Ende der vierten postoperativen Woche fortgeführt. Die insgesamt 50 Wistar-Ratten wurden entsprechend der MWF-Ratten ebenfalls in drei Protokollgruppen eingeteilt.

Protokoll-Gruppe	Stamm	Anzahl	Ratten gesamt
Gruppe 1	MWF _{sham}	N = 13	N_{gesamt} = 53
Gruppe 2	MWF _{Nx}	N = 29	
Gruppe 3	MWF _{NxACEi}	N = 11	
Gruppe 4	Wistar _{sham}	N = 14	N_{gesamt} = 50
Gruppe 5	Wistar _{Nx}	N = 21	
Gruppe 6	Wistar _{NxACEi}	N = 15	

Tabelle 2.1.: Gruppeneinteilung nach Stämmen und Operationsprotokoll. MWF: Munich-Wistar-Frömter-Ratte; Wistar: Wistar-Ratten; sham: schein-operiert; Nx: subtotale Nephrektomie; ACEi: behandelt mit einem Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer. N: Anzahl der Ratten pro Gruppe.

Alle Tiere wurden zur Operationsvorbereitung aus den Gemeinschaftskäfigen genommen und in Einzelkäfige gesetzt. Sie wurden gewogen und in den Operationsraum gebracht. Durch intraperitoneale Injektion von Ketanest S25 (0,174mg/100g Körpergewicht [KG]) plus Xylazin 2 % (0,065mg/100g KG) wurden die Tiere narkotisiert. Bestand nach ca. fünf Minuten keine ausreichende Narkosetiefe, wurde Ketanest S25 in halbiertem Initialdosis erneut injiziert. Reichte dies weiterhin nicht aus, setzte man das Tier in seinen Käfig zurück. Eine andere Ratte wurde für die Operation ausgewählt. Nach Rasur der Bauchdecke konnten die Ratten in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert werden. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen der Ratten mit Bepanthen-Augensalbe benetzt. Die Tiere atmeten unter Narkose spontan Raumluft. Eine künstliche Beatmung war nicht notwendig. Durch einen median geführten ca. 4 cm langen Schnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet. Um ein schnelles und sicheres Operieren zu gewährleisten, wurden die folgenden Schritte unter Zuhilfenahme eines binokulären Operationsmikroskops der Firma Zeiss bei neunfacher Vergrößerung durchgeführt. Nach Freilage der Nierenlager linksseitig konnte das Peritoneum parietale hilusnah inzidiert werden. Die Vena renalis und die auf ihr reitende Arteria renalis konnten durch stumpfe Präparation mittels eines Wattestäbchens von Peritoneum und Fettgewebe befreit werden. In ca. 80 % der Fälle teilte sich die Arteria renalis vor Eintritt in die Niere dichotom in einen ventralen und einen dorsalen Ast. Durch Umstechung und Ligatur des ventralen Astes mit Monofilament 6-0 wurde die arterielle Versorgung des ventralen Nierenparenchyms unterbunden. Das ischämische Nierengewebe verfärbte sich innerhalb weniger Sekunden dunkel, so dass eine Kontrolle der subtotalen Nephrektomie innerhalb weniger Minuten in situ möglich war. Dank recht konstanter anatomischer Verhältnisse reichte die Unterbindung eines Arterienastes in der Regel aus, um ein Infarktgebiet von ca. 60 bis 70 % des Nierengewebes zu erhalten. In Ausnahmefällen musste ein weiterer Nebenast der Arteria renalis ligiert werden, um eine ausreichende Infarktgröße zu erzielen. Es folgte die rechtsseitige Nephrektomie unter Schonung der rechten Nebenniere. Nach einer erneuten Kontrolle der Gefäßstümpfe sowie des Ausmaßes der ischämischen Zone an der linken Niere wurden das Peritoneum und die Bauchmuskulatur mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Die abschließende Hautnaht wurde intrakutan genäht, um ein eigenständiges Eröffnen der Wunde durch die Ratten zu verhindern. Nach Säuberung der Bauchdecke konnte die Operation abgeschlossen werden. Im Untersuchungszeitraum eröffnete sich keines der Tiere die Wunde. Bei den Schein-Operationen an den Ratten der Gruppen 1 und 4 entsprach die Vorbereitung und Narkose dem Ablauf der anderen Protokollgruppen. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde lediglich das Peritoneum über

der linken und rechten Niere stumpf mit einem Watteträger entfernt. Eine weitere Manipulation erfolgte nicht. Beide Nieren wurden in ihrer vollen Integrität belassen. Die Versorgung der Bauchdecke und die abschließende Hautnaht erfolgten in allen Operationsgruppen identisch. Zur postoperativen Schmerztherapie wurde dem Trinkwasser an den folgenden drei Tagen Paracetamol-Saft in einer Dosierung von 2mg/100g KG zugegeben. Die Ratten erholten sich vom operativen Eingriff relativ schnell. Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere drei Wochen in ihren Gemeinschaftskäfigen gehalten. Sie hatten während der gesamten Versuchsdurchführung freien Zugang zu Wasser und Futter. Ihr Allgemein- wie Ernährungszustand wurde täglich kontrolliert. Marker hierfür waren das Aussehen des Fells, der Bewegungsradius sowie der allgemeine Eindruck, den die Ratten in ihren Käfigen erweckten. Tiere in schlechtem Allgemein- wie Ernährungszustand wurden eingeschläfert, um ein unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden. In der vierten postoperativen Woche erfolgten die abschließenden Untersuchungen.

Die Bestimmung des systolischen Blutdruckes erfolgte zu Beginn der vierten postoperativen Woche. Die Blutdruckmessung wurde mittels einer nicht-invasiven Tailcuff-Methode an wachen und entspannten Tieren durchgeführt. Für diese Arbeit wurde eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik der Firma TSE, Bad Homburg eingesetzt. Zur Messung des Blutdruckes wurden die Tiere einzeln in eine schmale Kunststoffröhre gesetzt, welche sich in einer bei 35° Celsius beheizten Kammer befand. Durch die hohe Umgebungstemperatur erhöht sich die Durchblutung des Rattenschwanzes. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Bestimmung des Blutdruckes mittels der Tailcuff-Methode. Über den Schwanz der Ratten befestigte man eine aufblasbare Druckmanschette sowie einen mit dem Computer verbundenen Pulssensor. Um stressbedingte Blutdruckspitzen zu vermeiden, gingen der eigentlichen Datenermittlung zur Gewöhnung der Ratten simulierte Messungen voraus. Die Ermittlung der in die Auswertung eingehenden systolischen Blutdruckwerte erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen mit täglich drei Messungen pro Tier, welche im Abstand von wenigen Minuten erfolgten. Als an den wahren systolischen Blutdruck angenäherten Wert wird der Mittelwert dieser neun Messungen angenommen. Zum Ende der vierten postoperativen Woche wurden die Tiere aus den Räumen des FEM in die Tierställe des Instituts für Klinische Pharmakologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, verbracht. Die Tiere wurden gewogen und ihr Allgemein- wie Ernährungszustand beurteilt. Durch intraperitoneale Injektion von Ketamin S25 (0,174mg/100g KG) und Xylazin 2 % (0,065mg/100g KG) wurden die Tiere narkotisiert. Für das weitere Vorgehen wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch fixiert. Um ein

Kollabieren der Lunge nach erfolgter Thorakotomie zu verhindern, wurden die Tiere intubiert und beatmet man die Tiere über einen Respirator (Rodent Ventilator, Typ 7025, UGO Basile). Als Tubus diente eine Verweilkanüle (26G), die nach Tracheotomie in die Luftröhre eingeführt wurde. Unter künstlicher Beatmung mit Raumluft war eine ausreichende Oxygenierung des arteriellen Blutes während der gesamten Katheteruntersuchung sichergestellt. Nach erfolgter linksseitiger Thorakotomie konnte der linke Ventrikel apexnah mit einer Verweilkanüle punktiert werden. Über diese Kanüle wurde ein Millar-Katheter (Modell SPR-401, 2F) in den linken Ventrikel eingeführt. Bei sachgerechter Durchführung war der Blutverlust gering. Der Katheter war mit einem PC der Firma TSE BIOSystems GmbH, verbunden. Die korrekte Lage der Katheterspitze wurde anhand der aufgezeichneten Druckkurven kontrolliert. Den korrekten Verlauf zeigt Abbildung 2.2. Für die Beurteilung der myokardialen Funktion gingen drei Parameter in die Messungen ein. Diese waren der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg), die linksventrikuläre Kontraktionsfähigkeit ($+dP/dt/LVP_{\max}$) gemessen als erste Ableitung der linksventrikulären Druckänderung ($+dP$) nach der Zeit (dt) in der Kontraktionsphase normalisiert nach dem maximalen linksventrikulären Druck (LVP_{\max}) desselben Herzzykluses. Analog erfolgt die Bestimmung der linksventrikulären Relaxationsfähigkeit ($-dP/dt/LVP_{\max}$) als erste Ableitung der linksventrikulären Druckänderung ($-dP$) nach der Zeit (dt) in der Relaxationsphase normalisiert nach dem maximalen linksventrikulären Druck (LVP_{\max}) desselben Herzzykluses. Die Änderung des Druckes nach der Zeit ist vom erreichten Maximaldruck des Herzzykluses abhängig. Da sich die systolischen Blutdruckwerte in den Operationsgruppen signifikant unterscheiden, liefert erst die Normalisierung nach dem Maximaldruck LVP_{\max} vergleichbare Daten für die weitere statistische Auswertung der linksventrikulären Myokardfunktion. Die Abbildung 2.2 zeigt einen typischen Ausschnitt der hämodynamischen Messungen. Dargestellt ist der diastolische linksventrikuläre Druckverlauf in MWF_{sham} und MWF_{N_x} über ein Zeitintervall von drei Herzzyklen. Der steile Abfall am Anfang eines Zykluses stellt das Absinken des linksventrikulären Druckes nach Schluss der Aortenklappe dar. Der Druck im Ventrikel fällt auf wenige Millimeter Quecksilbersäule ab. Während der diastolischen Füllung steigt der linksventrikuläre Druck langsam an. Er erreicht sein Maximum am Ende der Diastole kurz vor Einsetzen der Kontraktion der Ventrikelmuskulatur, welche den Beginn der Systole markiert. Diesen maximalen Druck am Ende der diastolischen Füllungsphase bezeichnet man als linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP). Er wird ebenfalls in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) angegeben.

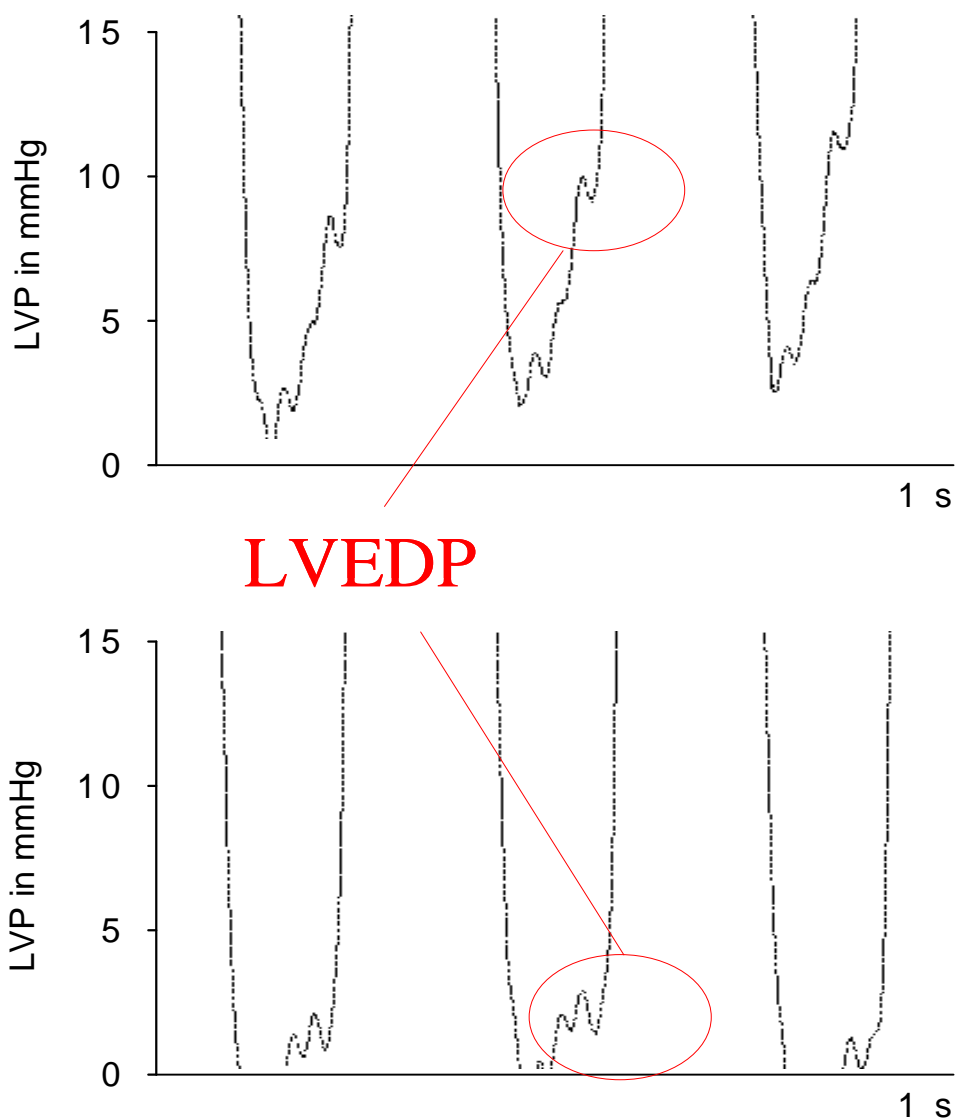


Abbildung 2.2: Aufzeichnung des linksventrikulären diastolischen Druckverlaufes in Abhängigkeit der Zeit mittels Micro-Tip Katheter an beatmeten MWF_{Nx} (obere Abbildung) und MWF_{sham} Ratten (untere Abbildung). LVP: linksventrikulärer Druck in mmHg; LVEDP: linksventrikulärer enddiastolischer Druck; rote Markierung: Ablesepunkt für den LVEDP-Wert; s: Zeit in Sekunden. Nx: subtotale Nephrektomie. sham: schein-operiert.

Nach durchschnittlich vierminütiger Aufzeichnung wurde die Messung durch Entfernung des Katheters beendet. Über die liegende Kanüle konnte das gesamte Blut der Ratte abgenommen werden. Dies führte zum Tode des Tieres. Nach zwanzigminütiger Lagerung bei Raumtemperatur konnte das geronnene Blut 15 Minuten bei 8000 Umdrehungen pro Minute und bei 4° Celsius zentrifugiert werden. Das Serum wurde abpipettiert und in 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sofort nach der Blutentnahme wurde die Bauch- und Brusthöhle

durch einen median geführten Schnitt eröffnet. Herz, Niere und Leber wurden makroskopisch begutachtet. Das Herz wurde entnommen und nach Abtrennung der großen Gefäße sowie Entfernung von Blutresten gewogen. Der rechte Ventrikel wurde septumnah vom linken Ventrikel abgetrennt und in einem 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Ventrikel wurde erneut gewogen. Bei unterschiedlichem Körpergewicht innerhalb der einzelnen Gruppen wurden zur Verbesserung der Vergleichbarkeit die einzelnen Herzgewichte nach dem Körpergewicht normalisiert. Dies gelang durch Bildung des Quotienten aus dem Herzgewicht (Hwt) und dem Körpergewicht am Tötungstag (KG_T). Analog erhält man die normalisierten Werte für den linken Ventrikel ($LVwt/KG_T$) sowie den rechten Ventrikel ($RVwt/KG_T$). Die Herzspitze wurde abgetrennt und schockgefroren. Zusätzlich schnitt man eine ungefähr 2 mm breite Scheibe aus dem Ventrikel heraus. Zur Vorbereitung der weiteren histologischen Aufarbeitung wurde das Präparat zur Fixierung in Duboscq-Brasil Lösung gelegt. Der restliche Ventrikel wurde ebenfalls schockgefroren. Es folgte die Entnahme der linken Niere. Die Bestimmung des Gewichtes der Niere erfolgte nach Entfernung des nekrotischen Gewebes. Ein Teil des Parenchyms wurde abgetrennt und in Methacarn-Lösung fixiert. Das restliche Nierengewebe wurde wiederum in 2 ml Eppendorfröhrchen gelegt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Weiterhin wurden jedem Tier beide Lungenflügel, ein Stück Aorta, ca. 2 ml Lebergewebe sowie die Nebennieren entnommen. Alle Organe wurden nach Säuberung in Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Entsorgung der Rattenkadaver erfolgte durch die Tierkörperbeseitigung des Hauses. Nach zwölf bis 20 Stunden konnten die Herz- bzw. Nierenschnitte aus ihren Fixierlösungen entnommen und in 80%iges Ethanol bis zur späteren histologischen Aufarbeitung konserviert werden. Sämtliche in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Organproben lagern bei minus 79° Celsius in Tiefkühlschränken in den Räumen der Klinischen Pharmakologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

2.2.3 Statistische Analyse und graphische Darstellung

Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS 11.0 für Windows, der Firma SPSS Inc. 1981-2001. Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes (mean \pm SEM) angegeben. Der Gebrauch der SEM weist den Vorteil auf, dass seine Anwendung bis zu einer gewissen Grenze auch bei Stichproben möglich ist, die nicht aus einer symmetrisch-eingipfligen Grundgesamtheit stammen¹²⁷. Die Verwendung der Standardabweichung des Mittelwertes bietet sich somit bei geringen Gruppengrößen an. Die statistische Analyse erfolgte durch nicht-parametrische Testung nach Mann-Whitney. Zur Berücksichtigung der Alpha-Fehler Kumulierung erfolgte zusätzlich eine Adjustierung nach Bonferroni. Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ als signifikant angenommen.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Sigmaplot 8.0 für Windows, der Firma SPSS Inc., verwendet.