

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. OP-Material**

- Ketamin (Ketanest®) 0,174 mg/Kg KG
- Xylazin 2% 0,065mg/Kg KG
- Braunol®-Lösung (Firma Braun)
- Injektionsbesteck zur Intraperitonealnarkose
- Operationsbesteck
- Stumpfe Haken
- Nahtmaterial (Ethicon Vicryl 6/0 USP, Metric 1 (Ligatur), Dexon Bicolor II, 3/0 USP, Metric 2 (Muskel-/Hautnaht)
- Panthenol-Augensalbe
- Paracetamol-Lösung

#### **2.1.2. Tierhaltung**

- Gemeinschaftskäfige Makrolon Typ 4
- Steriles Wasser
- Weichholzgranulat
- Altromin® - Tierfutter (Altromin GmbH Lage/Lippe)
- Nebivolol-Sonderfutter (Dosis 10mg Kg KG/d)

#### **2.1.3. Blutdruckmessung**

- Wärmekammer
- Computergestützter Schwanzpletysmograph (Firma TSE, Bad Homburg)
- Restraîner

#### **2.1.4. 24h-Urin**

- Stoffwechselfäße

#### **2.1.5. Blutprobenentnahme und Organpräparation**

- Eppendorf-Gefäße Safe-Lock 0,5ml, 1,5ml
- Eppendorf-Pipettenstandardtipps 1000µl, 500µl, Eppendorf AG/Hamburg
- Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG/Hamburg
- Glasgeräte (Firma Braun KG, Melsungen)
- Analysenwaage (Sartorius AG)
- Flüssiger Stickstoff
- Picrinsäure
- Methacarn (60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig)
- Ethanol 75%

### **2.2. Methoden**

#### **2.2.1. Tierexperimentelle Untersuchungen**

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von insgesamt acht Monaten durchgeführt. Die Eingriffe erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, Charité. Unter der Genehmigungsnummer G 0093 / 01 wurden die beschriebenen Tierversuche durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. Die Eingriffe erfolgten sämtlich nach dem nach den Richtlinien festgelegten methodischen Vorgehen. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Tiere dem entsprechenden gruppenspezifischen operativen wie postoperativen Procedere unterzogen.

### **2.2.2. Tierstamm und Haltung**

Wir verwendeten für die Studie ausschließlich männliche Wistar-Ratten, ein gesunder Rattenstamm, welche über die Charles River Deutschland GmbH bezogen wurden. Die Tiere wurden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der FU Berlin (FEM) gehalten und versorgt. Die in 2.2.3.2. beschriebene Operation sowie die in 2.4. beschriebene Blutdruckmessung wurde in eigens hierfür vorgesehenen Räumen des FEM durchgeführt.

Während der vierwöchigen Versuchsdauer wurden je drei bis fünf Tiere in Makrolon-Gemeinschaftskäfigen gehalten und versorgt. Hierbei war der Zugang zu Futter und Wasser ad libitum zu jeder Zeit gegeben. In den Tierställen herrschten konstante Bedingungen. Die Temperatur lag bei 22° C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Durch eine zeitlich gesteuerte Beleuchtungsperiodik wurden Hell-Dunkel-Phasen von jeweils zwölf Stunden erzeugt und somit ein physiologischer Tag-Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Die abschließende Linksherzkatheteruntersuchung sowie die Organentnahme wurde in den Räumen der klinischen Pharmakologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in ihren Käfigen aus dem FEM in die Klinik überführt und dort zur Akklimatisierung für 24 Stunden ungestört belassen, bevor die abschließenden Untersuchungen durchgeführt wurden. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der Allgemein- und Ernährungszustand der Tiere täglich kontrolliert. Hierbei wurden Aktivität, Fellzustand und allgemeiner Eindruck als Parameter herangezogen. Im Fall einer deutlichen Aktivitätsminderung und Verschlechterung des Allgemeinzustandes einzelner Exemplare wurden diese zur Verhinderung von unnötigem Leiden eingeschläfert.

### **2.2.3. OP-Technik**

Für den gesamten Versuch wurden lediglich Tiere in der 12. bis 13. Lebenswoche verwendet, deren Gewicht sich zum Zeitpunkt der Operation zwischen 300 und 350g bewegte. Die Operation wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Operationsbesteck wie Operationsfeld wurden nach jeder Operation gewaschen und mit Braunol®-Lösung desinfiziert.

### **2.2.3.1. OP-Vorbereitung**

Nach dem Transport vom Tierstall in den Vorbereitungsraum wurden die Tiere aus den Gemeinschaftskäfigen in Einzelkäfige umgesetzt, gewogen und entsprechen ihrem individuellen Gewicht narkotisiert. Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Ketanest S 25 in einer Dosis von 0,172mg/100g Körpergewicht sowie Xylazin 2% in einer Dosis von 0,065mg/100g Körpergewicht. Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere in die Einzelkäfige zurückgesetzt und engmaschig beobachtet. In Einzelfällen mussten Anästhetika in niedriger Dosierung nachapplied werden.

Nach Eintritt der Narkose etwa 10-15 Minuten nach Injektion wurden die Tiere großflächig im Bereich des Abdomens rasiert und in den Operationsraum überführt. Dort wurden sie atraumatisch in Rückenlage auf der Operationsunterlage fixiert und der zuvor rasierte Bereich mit jodhaltiger Desinfektionslösung desinfiziert. Mit Hilfe einer anatomischen Pinzette wurde die Zunge manuell extrahiert, um eine ausreichende Spontanatmung zu gewährleisten und eine Verlegung der oberen Atemwege im Verlauf der Operation zu verhindern. Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde eine panthenolhaltige Augensalbe appliziert.

### **2.2.3.2. Technik der 5/6-Nephrektomie**

Voraussetzung für den Beginn der Operation war eine adäquate Narkosetiefe, welche durch Setzen von Schmerzreifen mittels einer chirurgischen Pinzette in eine Pfote bestimmt werden konnte. Bei Ausbleiben eines Schmerzreflexes erfolgte der erste Schritt der Op. Hierzu wurde eine mediane Laparotomie mit Spaltung von Haut, Muskulatur, Faszie und Peritoneum durchgeführt, um freien Zugang zur Bauchhöhle zu erhalten. Magen, Darm, Leber und Milz konnten durch Einsatz von Wattestäbchen nach lateral und cranial verdrängt und mit stumpfen Haken fixiert werden. Somit wurde eine gute Übersicht über die zunächst zu präparierende linke Niere gewährleistet. Die Präparation der linken Niere gestaltete sich aufgrund des längeren Gefäßstranges, der tieferen Lage sowie der ausbleibenden Verdrängung durch die Leber einfacher. Ziel war die Ligatur von ein bis zwei Seitenästen der Arteria renalis sinistra zur Unterbindung der Blutversorgung der ihnen zugeordneten Parenchymanteile. Hierzu wurde hilusnah das auf dem Gefäßstrang liegende Peritoneum parietale inzidiert und mitsamt peritonealem Fettgewebe entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Darstellung der Arteria renalis sowie ihrer Aufteilung in einen ventralen und dorsalen Hauptstamm. Durch kurzzeitiges Abklemmen der dargestellten Äste war eine Zuordnung zu

den jeweils versorgten renalen Parenchymanteilen möglich. Diese äußerte sich in der sofortigen ischämischen Aufhellung des nicht mehr durchbluteten Nierenareals. Auf diese Weise wurde es möglich, durch gezielte Identifikation und konsekutive Ligatur einzelner arterieller Seitenäste die Perfusion von letztlich ca. 2/3 der linken Niere dauerhaft zu unterbinden. Die livide Verfärbung des untergegangenen Parenchymanteils als Zeichen seiner Infarzierung ca. fünf bis zehn Minuten nach der Ligatur verifizierten den Op-Erfolg.

Nach regelgerechter Ligatur der A.renalis sinistra konnte im nächsten Schritt mit der Präparation der rechten Niere begonnen werden. Hierfür wurden zunächst abermals benachbarte Organe in der oben beschriebenen Weise mit Wattestäbchen und stumpfem Haken verdrängt. Die rechte Niere wurde unter Schonung der Nebenniere, der Leber und des rechten Nervus femoralis stumpf aus ihrem Lager herauspräpariert. Nach ihrer Freilegung konnte im nächsten Schritt der gesamte Gefäßstamm mitsamt Urether mittels Ligatur unterbunden werden. Zur Vermeidung von Nahtinsuffizienzen und der daraus resultierenden Gefahr von tödlichen Nachblutungen wurde die erste Ligatur durch eine zweite weiter medial in Richtung Aorta verstärkt. Dies geschah unter Verwendung einer gebogenen Pinzette sowie einer nichtresorbierbaren Handseide der Stärke 0. Zuletzt wurde die Niere mit einer stumpfen Pinzette gegriffen, Gefäßstamm und Ureter mit einer Präparierschere weit distal durchtrennt und das Organ auf diese Weise komplett entfernt. Nach Kontrolle des Gefäßstumpfes auf Nahtinsuffizienzen war die operative Reduktion des Nierengewebes um 5/6 abgeschlossen. Nach nochmaliger Kontrolle des Op-Erfolges auf der Gegenseite wurde mit dem Verschluss der Bauchhöhle begonnen. Der Verschluss von Peritoneum und Muskelfaszie erfolgte durch fortlaufende Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial. Die Hautwunde wurde mittels fortlaufender Naht intrakutan vernäht, um eine Eröffnung durch das Tier zu vermeiden. Zuletzt wurde der einzig zugängliche Knoten der Naht mittels eines Hautlappens gedeckt. Die Eröffnung der Wunde durch das Tier selbst oder die Artgenossen konnte auf diese Weise in allen Fällen verhindert werden.

Nach Desinfizieren der Wunde wurde das Tier in einem vorgewärmten, mit Zellstoff ausgelegtem Käfig in Seitenlage bis zum Abklingen der Anästhesie beobachtet, um einer möglichen Ateminsuffizienz durch Aspiration und Verlegung der oberen Atemwege begegnen zu können. Postoperativ wurden die Tiere erneut in Gemeinschaftskäfigen zu zwei bis fünf Individuen gehalten. Hierbei bestand Zugang zu Wasser und Nahrung ad libitum. Eine postoperative Analgesie war durch im Trinkwasser gelöstes Paracetamol in den ersten drei postoperativen Tagen gewährleistet.

#### **2.2.4. Applikation von Nebivolol**

Die Zufuhr von Nebivolol geschah in der entsprechenden Tiergruppe mittels eines mit dem Wirkstoff versetzten Sonderfutters in einer Dosierung von 10mg/Kg KG/d per os bei ausschließlicher Verfügbarkeit des Sonderfutters in der nephrektomierten Nebivolol-Gruppe.

#### **2.2.5. Blutdruckmessung**

Die systolische Blutdruckmessung erfolgte in der vierten postoperativen Woche mittels nichtinvasiver Schwanzplethysmographie am wachen Tier. Hierbei handelt es sich um ein computergestütztes Verfahren, bei der der Fluss in der Schwanzarterie ähnlich der Methode nach Riva-Rocci durch Erhöhung des Manschettendrucks zunächst unterbunden und danach durch langsames Senken des Manschettendrucks wieder ermöglicht wurde. Im Gegensatz zur Methode am Menschen wurde bei der hier angewandten Technik mittels eines nachgeschalteten Transducers das Sistieren sowie das erneute Auftreten eines arteriellen Flusses aufgenommen, in ein digitales Signal umgewandelt und mit einem zugehörigen Computerprogramm als U-förmige Kurve mit breiter Basis ( als Ausdruck des sistierenden Blutflusses bei entsprechend hohem Manschettendruck) aufgezeichnet. Der systolische Blutdruck der Tiere wurde somit in Form zweier einander zugehöriger Druckwerte ausgedrückt.

Zur Durchführung dieses Verfahrens wurden die Tiere einzeln aus den Gemeinschaftskäfigen entnommen und in einen vorgewärmten röhrenartigen Metallkäfig (Restrainer) überführt, welcher durch Fixierung des Tieres ein Anbringen von Blutdruckmanschette und Transducer unkompliziert zuließ. Anschließend wurden die Tiere in eine auf 35°C vorgewärmte Kammer gesetzt und einer Aufwärm- und Eingewöhnungsphase von ca. 20 Minuten unterzogen, bevor mit Messungen begonnen wurde.

Es wurden je drei Messungen mit jeweils zwei systolischen Blutdruckwerten durchgeführt. Zur Gewöhnung an die Bedingungen der Messung und zur Minimierung des Effektes von Streuwerten wurden in allen Fällen zunächst mehrere Probeversuche unternommen, zudem wurde an insgesamt drei Tagen hintereinander zu ähnlichen Tageszeiten der Blutdruck bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden im PC gespeichert und anschließend pro Individuum gemittelt.

### **2.2.6. Asservation des Urins und Nierenfunktionsbestimmung**

Am Ende der vierten Woche wurden alle Tiere einzeln in einen speziellen Stoffwechsellkäfig überführt, welcher bei freiem Zugang zu Futter und Wasser die Asservation des 24h-Urins ermöglichte. Der Auffangmechanismus dieser Käfige beruht auf der Tatsache, dass ihr Boden vollständig aus einem Metallgitter besteht, welches sowohl von Kot wie auch von Urin passiert werden kann. Flüssigkeiten fließen hierbei aufgrund ihrer Oberflächenspannung an der Wand eines an der Unterseite des Käfigs angeschlossenen, sich nach unten verjüngenden Kunststoffkegels entlang, welcher sie von festen Exkrementen trennt. In einem Kunststoffgefäß an der Spitze des Kegels werden diese flüssigen Exkremente aufgefangen, gesammelt und einer weiteren Untersuchung zugänglich gemacht. Die Bestimmung der Protein- und Albuminkonzentrationen der individuellen Proben erfolgte labortechnisch in den Räumen des Institutes für klinische Pharmakologie im UKBF in Berlin-Steglitz.

### **2.2.7. Asservation von Blut- und Serumproben**

Zum Ende der vierten postoperativen Woche wurden die Tiere gewogen und ihr Allgemein- wie Ernährungszustand beurteilt. Für die Narkosevorbereitung setzten wir die Ratten wiederum in Einzelkäfige. Durch intraperitoneale Injektion von Ketamin S25 ( 0,174 mg / 100g KG ) und Xylazin 2% ( 0,065 mg / 100 g KG ) wurden die Tiere narkotisiert. Nach einer Herzkathetheruntersuchung für andere Untersuchungszwecke trat der Tod der Tiere durch Ausbluten über eine Verweilkanüle ein. Das aufgefangene Blut wurde 20 min bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für 15 min bei 8000 U / min und 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und in 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei - 79 °C. Aus diesen Proben wurde später die Konzentration von Kreatinin und anderer Serumparameter ermittelt. Durchgeführt wurden diese Arbeiten vom Labor 28 in Berlin-Wilmersdorf.

### **2.2.8. Organentnahme**

Unmittelbar nach der Blutentnahme eröffneten wir Bauch- und Brusthöhle mittels Medianschnitt. 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. Die Herzspitze wurde abgetrennt und ebenfalls schockgefroren. Niere, Nebennieren Lunge, Leber und Aorta wurden auf gleiche Weise präpariert sowie in Anteilen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Rattenkadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung des Hauses entsorgt. Sämtliche in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Organproben wurden bei - 79 °C in den Räumen der Klinischen Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Berlin für die Verwendung in weiterführenden Studien eingelagert.

### 2.2.9. Kreatinin-Clearance

Die Clearance-Leistung des gesamten Nierengewebes eines Organismus ist definiert als dasjenige Plasmavolumen, welches innerhalb einer Zeiteinheit durch Harnbildung von einer bestimmten Substanz gereinigt wird. Sie wird üblicherweise in der Einheit [ml/min] ausgedrückt. Zur Einschätzung der Nierenfunktion in den drei zu analysierenden Tiergruppen kam in der vorliegenden Studie die auch im Rahmen von klinischen Fragestellungen gebräuchliche Bestimmung der Kreatinin-Clearance zur Anwendung. Hierbei gilt die Formel:

$$C_{\text{Kreatinin}} = U \times UV / S \times t$$

Mit :

[C]: Kreatinin-clearance in ml/min

[U]: Kreatininkonzentration im 24h-Urin (mg/dl)

[UV]: Uringesamtvolumen in 24h (ml)

[S]: Kreatininkonzentration im Serum (mg/dl)

[t] : Zeit (min)

Die Kreatinin-Clearance ist insofern ein geeignetes Maß, als dass es im Glomerulus frei filtrierte werden kann und im Tubulus keine Rückresorption der Substanz erfolgt. Zudem fällt es als Endprodukt des Muskelstoffwechsels physiologischerweise in konstanter Menge an, so dass ein annähernd konstantes Fließgleichgewicht zwischen Produktion und Ausscheidung vorgefunden wird. Aufgrund dieser Gegebenheiten kann die Kreatinin-Clearance als angenähertes Maß zur Einschätzung der glomerulären Filtrationsrate dienen.



Die Tatsache, dass Kreatinin zu einem geringen Anteil im renalen Tubulussystem aktiv sezerniert wird führt dazu, dass die effektive Filtrationsleistung des Nierenparenchyms (in allen Tiergruppen auf gleiche Weise) in geringem Maße überschätzt wird.

#### **2.2.10. Statistische Analyse**

Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows, der Firma SPSS Inc. 1981-2001. Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( mean  $\pm$  SEM ) angegeben, da der SEM sich besonders für Untersuchungen an kleineren Gruppengrößen bewährt hat. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-Test für nicht-parametrisch verteilte Populationen. Statistische Unterschiede wurden bei einem  $p < 0,05$  als signifikant angenommen. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SIGMAPLOT verwendet.