

2. Material und Methode

2.1 Studiendesign

Um den kardialen Phänotyp im Rahmen der Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie zu untersuchen, wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten in diabetischen Ratten *in vivo* kontinuierliche Druck-Volumen-Schleifen des linken Herzens aufgezeichnet und mit denen von normoglykämischen Ratten verglichen. Um auch die belastungsabhängige Herzfunktion untersuchen zu können, wurden die Ratten während der jeweiligen Messung pharmakologisch gestresst. Der Beobachtungszeitraum betrug zwei beziehungsweise sechs Wochen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben „G0163“, die am 18.01.2002 erteilt wurde. Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde gemäß den Richtlinien des Deutschen Ethikrates und der US-Gesundheitsbehörde NIH durchgeführt.

2.2 Versuchsaufbau

Diese Studie wurde mit männlichen Sprague Dawley Ratten (SD) (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland) in einem Alter von 8 Wochen durchgeführt. Folgende Tiergruppen wurden untersucht:

1. Normoglykämische Ratten als Kontrollen (SD)
2. Diabetische Ratten 2 Wochen post STZ-Injektion (STZ-2w)
3. Diabetische Ratten 6 Wochen post STZ-Injektion (STZ-6w)

Die Anzahl der Tiere betrug in allen Gruppen n=8. Nach 2 bzw. 6 Wochen wurden die Tiere der invasiven Charakterisierung des kardialen Phänotyps zugeführt.

2.3 Versuchstierhaltung

Die Versuchstierhaltung fand in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Freien Universität Berlin (FEM) statt. Das Gewicht der Tiere betrug zu Studienbeginn zwischen 300-320 g. Die Ratten hatten freien Zugang zu dem Standardfutter Altromin C1000 (Fa. Altromin, Deutschland) und Wasser und wurden in einem klimatisierten Tierstall mit 12 Stunden Tages-/Nachtzyklus gehalten.

2.4 Induktion eines Diabetes Mellitus durch Streptozotozin

2.4.1 Methodik

Zur Induktion eines Diabetes Mellitus Typ I ähnlichen Zustandes wurde in dieser Studie Streptozotozin (STZ) (Sigma Aldrich, Deutschland) verwendet. STZ konnte in den sechziger Jahren aus dem Bakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert werden [25] und wurde als Breitspektrum-Antibiotikum eingesetzt. STZ besitzt darüber hinaus noch karzinogene Eigenschaften [26]. Eine einmalige Injektion von 70 mg/kg STZ intraperitoneal führt nach einigen Stunden zu einer Nekrose der β -Zellen im Pankreas. Da es sich dabei um eine hochspezifische Wirkung handelt, werden die α -Zellen und das exokrine Gewebe nicht beschädigt. So wird ein dem Menschen ähnlicher Diabetes Mellitus Typ I erzeugt. Da der Schweregrad eines STZ-induzierten Diabetes mellitus dosisabhängig ist, wurde in dieser Arbeit eine Dosis von 70mg/kg Körpergewicht STZ gewählt, die gleichsam eine sichere Diabetes-Induktion, aber auch eine geringe Mortalitätsrate gewährleistet. Bei der Ratte wird die intravenöse LD50 auf 140 mg/kg Körpergewicht geschätzt [27].

In die diabetischen Tiergruppen wurden ausschließlich Ratten aufgenommen, die ab dem 14. Tag nach STZ-Injektion einen Blutglukosespiegel initial von mindestens 550 mg/dl aufweisen konnten.

2.4.2 Prozedere

STZ wurde in Lösung (0,1 Mol Citratpuffer; 0,2 ml pro Tier) durch eine einmalige, intraperitoneale Injektion appliziert [28]. Da STZ licht- und thermoinstabil ist, wurde es innerhalb von 10 Minuten verabreicht. Um eine möglichst hohe Erfolgsquote bezüglich der Diabetesinduktion zu erzielen, wurden die Tiere vor der STZ Injektion einer Nahrungskarenz von 24 Stunden zugeführt. Diese wurde direkt nach der STZ Gabe beendet. Die jeweiligen Rattengruppen erhielten randomisiert 70 mg/kg STZ; die Kontrollen wurden mit dem Vehikel ohne Streptozotozin behandelt. Das Körpergewicht und der Blutglukosespiegel wurden im Abstand von einer Woche bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes kontrolliert. Zur Bestimmung des Blutglukosespiegels wurde Blut aus den Rattenschwanzkapillaren einem handelsüblichen Blutzuckermessgerät (Acutrend Sensor, Fa. Roche, Deutschland) zugeführt.

2.5 Hämodynamische Messungen

Mittels der so genannten Konduktanzmethode ist es möglich, den exakten Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve zu beschreiben. Dabei kann sowohl die systolische, als auch die diastolische Pumpfunktion des linken Ventrikels sehr genau bestimmt werden. Die Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven gilt daher als Goldstandard der Hämodynamik-Messung bei Menschen und großen Tieren [22].

Durch die Entwicklung eines Konduktanz-Katheters für Kleintiermodelle ist es nun gelungen, diese Druck-Volumen-Kurven auch *in vivo* im Maus- und Rattenmodell aufzuzeichnen [24]. So konnten wir zeigen, dass es mit dieser Technik möglich ist, die kardialen Auswirkungen z.B. nach Myokarditis [29] im Mausmodell zu beschreiben.

2.5.1 Der Konduktanz-Katheter

Der Konduktanz-Katheter besteht aus vier Elektroden und einem Drucksensor. Die Elektroden sind paarweise über und unter dem Drucksensor angebracht. Die paarweise angeordneten Elektroden messen die Leitfähigkeit des Blutes (Konduktanz) und somit das Volumen im linken Ventrikel. Die Messung von kardialen Blutvolumina mittels dieser Elektroden beruht auf einem elektrischen Feld, welches durch die äußeren Elektroden im linken Ventrikel aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden werden kontinuierlich aufgezeichnet und so die Konduktanz zwischen den Elektroden im Ventrikel zu messen. Da nicht zunächst nicht nur das intrakavitäre Blutvolumen, sondern auch andere Kompartimente, wie das myokardiale Blutvolumen erfasst wird, muss durch folgende Formel das intrakavitäre Volumen errechnet werden:

$$V_i(t) = (1/\alpha) (\rho L^2) [G_i(t) - G_{pi}].$$

Durch diese Formel kann das intraventrikuläre Volumen V_i errechnet werden. Hierbei ist α ein Volumen-Kalibrationsfaktor, ρ der elektrische Widerstand des Blutes, L der Abstand zwischen den Elektroden, G_i beschreibt die Gesamt-Konduktanz und G_{pin} die Konduktanz des umgebenden Gewebes, die so genannte „parallele Konduktanz“. Durch diese Berechnung ist es möglich, in Echtzeit und in vivo Druck und Volumen aufzuzeichnen, um so Druck-Volumen-Kurven zu erstellen.

2.6 Der operative Eingriff

2.6.1 Narkose

Zur Induktion der Narkose wurde das Barbiturat Pentobarbital (Narkoren®) verwendet. Hierbei wurden 60 mg/kgKG intraperitoneal gespritzt. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde ein Schmerzreiz gesetzt.

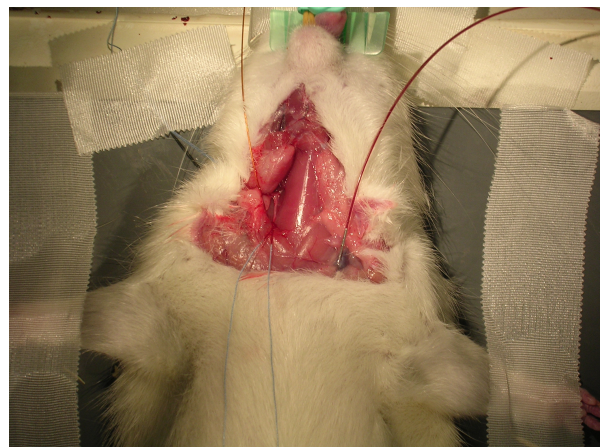
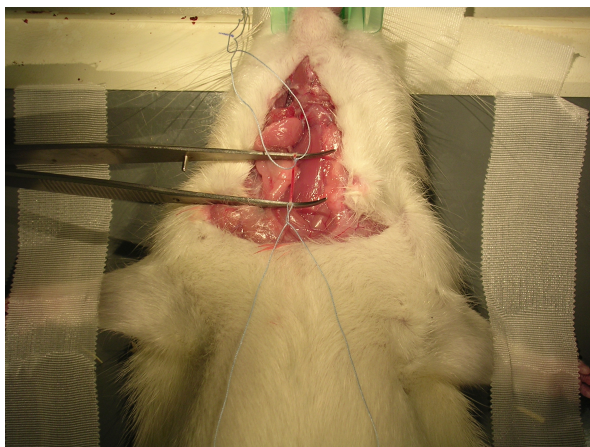
2.6.2 Intubation und Ventilation

Zur Intubation wurde die Ratte in Rückenlage fixiert. Danach wurde unter visueller Kontrolle ein Plastiktubus in die Trachea eingeführt um das Tier kontrolliert ventilieren (Mouse Minivent, Hugo Sachs, Deutschland) zu können. Die Ventilation mit Raumluft wurde mit einem Hubvolumen von 8 μ l/g Körpergewicht und 80 Zügen pro Minute durchgeführt. Der Erfolg der Intubation wurde visuell durch eine gleichmäßige, Respiator-abhängige Thoraxbewegung sichergestellt.

2.6.3 Linksventrikuläre Katheterisierung

Es wurde ein Hautschnitt in Längsrichtung von kaudal nach kranial durchgeführt und die Speicheldrüsen durchtrennt. Ein Blutverlust wurde dabei konsequent vermieden. Die rechte Arteria carotis communis wurde dargestellt und sowohl proximal als auch distal wurden Blutsperrern angelegt (Abb. 7). Mit Mikroinstrumentarium wurde der Konduktanzkatheter in das Gefäß eingebracht und danach retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und durch ständige Kontrolle der Druck-Volumen-Kurve optimal platziert.

Abbildung 2: Darstellung der A. carotis communis und Einführen des Konduktanzkatheters

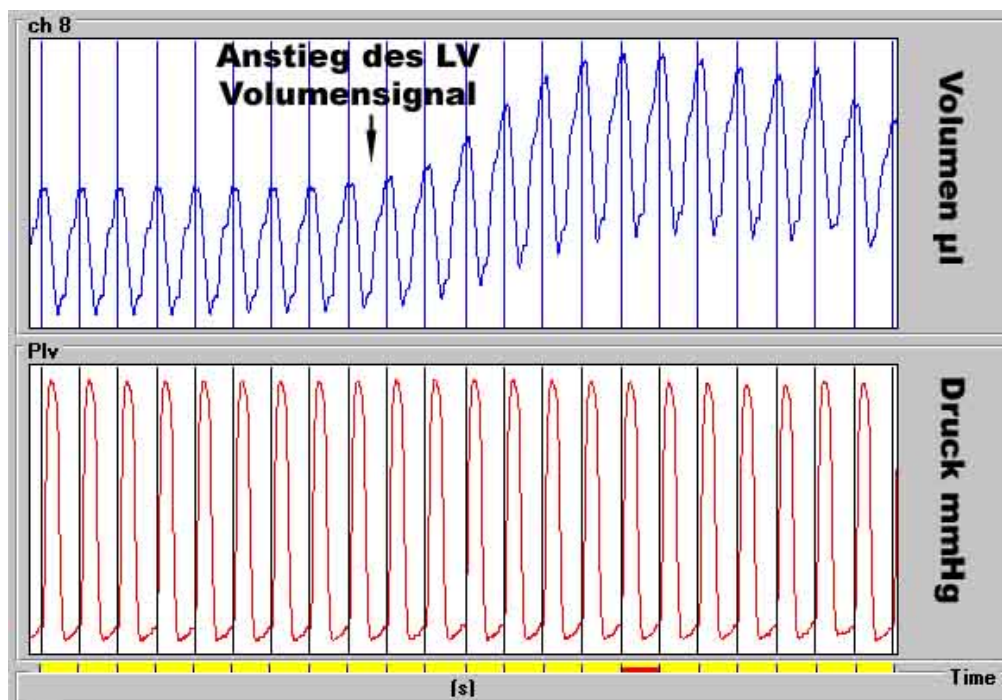


2.6.4 Ermittlung des intrakavitären Blutvolumens: Kalibrierung des Konduktanz-Signales

Wie oben beschrieben, misst der Konduktanz-Katheter zunächst nicht nur das intrakavitäre Blutvolumen, sondern auch die parallele Konduktanz, die sich z.B. durch das intramyokardiale Blutvolumen ergibt. Durch eine intravenöse Gabe von hypertoner Kochsalzlösung kann diese parallele Konduktanz ermittelt werden [30]. Durch Abzug der parallelen Konduktanz von der gemessenen Gesamtkonduktanz kann nun das tatsächliche intrakavitäre Blutvolumen bestimmt werden.

Hierzu wird die linke Vena jugularis punktiert. Anschließend werden 20µl 10%ige-NaCl Lösung infundiert. Das Konduktanzsignal im linken Ventrikel nimmt durch den Einstrom der hypertonen NaCl Lösung rapide zu, obwohl das Volumen unverändert bleibt (Abb. 8). Das zeigt, dass das Konduktanzsignal die Osmolarität des Volumens im linken Ventrikel angibt und daraus das Blutvolumen errechnet werden kann [22, 31].

Abbildung 3: Anstieg des Konduktanzsignals während intravenöser Gabe von 10%iger NaCl Lösung



2.6.5 Aufzeichnung der Hämodynamik

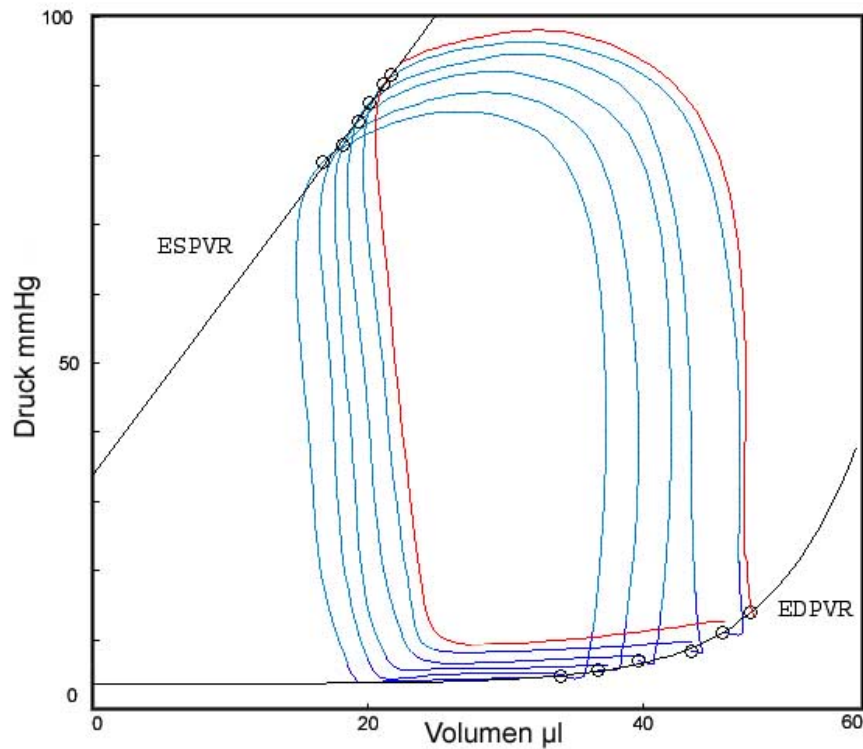
2.6.5.1 Vorlastabhängige Werte

Zur Aufzeichnung der vorlast-abhängigen Parameter der linksventrikulären Funktion wurde der Katheter nach optimaler Positionierung im linken Ventrikel fixiert. Für jede Aufzeichnung der Herzfunktion wurde die Ventilation für etwa fünf Sekunden abgestellt, in Apnoe atemunabhängige Druck-Volumen-Kurven aufzeichnen zu können. Dabei wurden jeweils ca. 30 Schläge aufgezeichnet und als Mittelwert aller Schläge ausgewertet.

2.6.5.2 Vorlastunabhängige Werte

Um auch vorlast-unabhängige Parameter bestimmen zu können, wurde im Anschluss eine Messung der linksventrikulären Funktion bei transienter Vorlastreduktion aufgezeichnet und analysiert. Hierfür wurde simultan zur Aufzeichnung eine Okklusion der Vena Cava durchgeführt. Diese wurde durch Abklemmung der Vena cava mit einer Pinzette nach Eröffnung der Bauchdecke für ca. 3 Sekunden sichergestellt. Durch diese transiente Vorlastreduktion fällt der linksventrikuläre Druck bei gleichzeitiger Abnahme des intrakavitären Volumens, so dass sich die Druck-Volumen-Schleife nach unten links bewegt.

Abbildung 4: Druck-Volumen-Kurven einer Kontrollratte während einer Vorlastreduktion durch eine Vena-Cava-Okklusion.



2.6.5.3 Gemessene Parameter zur Bestimmung der systolischen linksventrikulären Funktion

- Maximaler linksventrikulärer Druck (LVP in mmHg):

Der maximale linksventrikuläre Druck ist der höchste gemessene Druck im linken Ventrikel und ist daher ein Parameter der systolischen Herzfunktion.

- Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt max in mmHg/s):

Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ist ein Parameter der systolischen Funktion und insbesondere der Kontraktilität des linken Ventrikels. Mathematisch gesehen entspricht dieser Wert dem positiven, maximalen Y-Wert aus

der ersten Ableitung der Funktion, die den linksventrikulären Druckanstieg beschreibt. Graphisch entspricht der Wert dem Punkt der maximalen Steigung innerhalb der linksventrikulären Druckkurve.

- Schlagvolumen (SV μ l):

Das Schlagvolumen entspricht dem Volumen, welches pro Herzschlag durch die Aortenklappe in die Peripherie abgegeben wird. Es wird durch die Substraktion des End-systolischen Volumens (ESV) vom end-diastolischen Volumen (EDV) (beide Parameter werden unten näher beschrieben) errechnet ($EDV - ESV = SV$).

- Ejektionsfraktion (EF in %):

Die EF entspricht dem prozentualen Anteil des SV vom EDV ($EF = SV / EDV * 100$).

Sie stellt in der Klinik aus Gründen der Praktikabilität den wichtigsten Parameter dar, obwohl sie lediglich einen relativen Wert des in die Peripherie abgegebenen Blutvolumens angibt (Im Detail wird in der Diskussion auf diese Problematik eingegangen).

- Ea Nachlast (mmHg/ μ l):

Die Nachlast errechnet sich aus dem LVP geteilt durch das Schlagvolumen, also ($Ea = LVP / SV$). Die Ea ist ein Maß für den peripheren arteriellen Widerstand, der direkt auf die linksventrikuläre Funktion Einfluss nimmt.

- Endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR [englisch: „*end-systolic-pressure-volume-relationship*“] in mmHg/ μ l):

Die ESPVR wird während der Vena-Cava-Okklusion aufgezeichnet. Sie entspricht einem Graphen, der durch die Verbindung der end-systolischen Drücke der verschiedenen Herzschläge während der Vorlastreduktion durch eine Vena-Cava-Okklusion entsteht. So ergibt sich ein linearer Graph, dessen Steigung die Kontraktilität widerspiegelt. Wichtig ist hier, dass dieser Wert der einzig gemessene Wert für die systolische Pumpfunktion ist, der nicht vorlast-abhängig ist und somit dem validesten Parameter zur Beschreibung der Kontraktilität entspricht.

2.6.5.4 Gemessene Parameter zur Bestimmung der diastolischen linksventrikulären Funktion

- Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP in mmHg):

Der LVEDP ist in der Klinik einer der wichtigsten Parameter zur Beschreibung der diastolischen Pumpfunktion des linken Ventrikels.

- Maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\min} in mmHg/s):

Die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (die zunächst vielleicht verwirrende Abkürzung „ dP/dt_{\min} “ hat sich wahrscheinlich durchgesetzt um von der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}) zu abstrahieren) ist ein Parameter der frühen Diastole in der der Ventrikel aktiv relaxiert. Mathematisch gesehen entspricht dieser Wert dem negativen, minimalen Y-Wert aus der ersten Ableitung der Funktion, die den linksventrikulären Druckabfall während einer Herzaktion beschreibt. Graphisch entspricht der Wert dem Punkt der maximalen, negativen Steigung innerhalb der linksventrikulären Druckkurve.

- Tau (in ms):

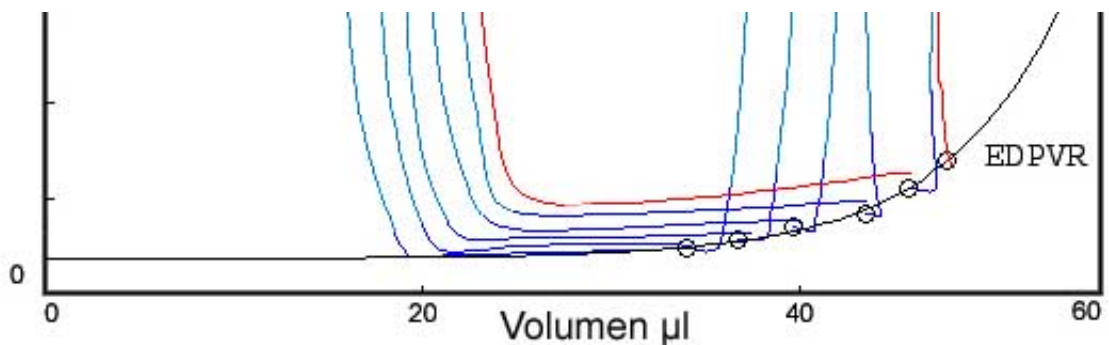
Tau ist wie dP/dt_{\min} ein Parameter der aktiven Relaxation der frühen diastolischen Herzaktion. Er entspricht dem Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Diastole, wenn der Druck noch 10% des maximalen LVP ist.

- End-diastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR [englisch: „*end-diastolic-pressure-volume-relationship*“] in mmHg/ μ l):

Die EDPVR wird wie die ESPVR während der Vena-Cava-Okklusion aufgezeichnet. Sie entspricht einem Graphen, der durch die Verbindung der end-diastolischen Drücke der verschiedenen Herzschläge während der Vorlastreduktion durch eine Vena-Cava-Okklusion entsteht (Abb. 10). So ergibt sich ein exponentieller Graph, dessen Krümmung im Mausmodell die myokardiale Steifigkeit widerspiegelt. Wichtig ist hier, dass dieser Wert der einzig gemessene Wert für die diastolische

Pumpfunktion ist, der nicht vorlast-abhängig ist. Er entspricht zusammen mit dem LVEDP dem validesten Parameter zur Beschreibung der linksventrikulären, diastolischen Funktion.

Abbildung 5: EDPVR, exponentiale Annäherung



2.6.5.5 Gemessene Parameter zur Bestimmung der globalen linksventrikulären Funktion

- Herzfrequenz (HF in min^{-1}):

Die HF gibt die Herzschläge pro Minute an und nimmt aktiv Einfluss auf das Herz-Zeit-Volumen

- Herz-Zeit-Volumen (HZV in ml/min):

Das HZV ist neben dem linksventrikulären Druck der wichtigste Parameter für die Leistungsfähigkeit des linken Ventrikel. Es errechnet sich aus dem Schlagvolumen und der Herzfrequenz ($\text{HZV} = \text{SV} * \text{HF}$).

- End-diastolisches Volumen (EDV in $\mu\text{l}/\text{min}$):

Das EDV wird benötigt, um das Schlagvolumen zu ermitteln und ist ein Maß für die Ventrikelgröße

- End-systolisches Volumen (ESV in $\mu\text{l}/\text{min}$):

Das ESV wird benötigt, um das Schlagvolumen zu ermitteln und ist wie das EDV ein Maß für die Ventrikelgröße.

2.6.5.6 Messung der belastungs-abhängigen Herzfunktion

Zur Messung der belastungs-abhängigen Herzfunktion wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet, die sowohl das Beta-Rezeptor-abhängige Ansprechen auf einen pharmakologischen Stress, als auch die maximale Herzleistung berücksichtigte.

Messung der Beta-Rezeptor-abhängigen Herzfunktion

Zur Beurteilung der Dosis-abhängigen Herzfunktion wurden zunächst drei verschiedene Konzentrationen Dobutamin ([Sigma] 0,75, 2,5 and 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) mittels eines Mikroperfusor (Havard) über die rechte Vena jugularis infundiert. In diesen Dosen wirkt Dobutamin β -Rezeptoren-selektiv [32]. Die Herzfunktion wurde jeweils nach drei Minuten Infusion aufgezeichnet.

Messung der maximalen Herzfunktion

Nachdem die Herzfunktion wieder Basalwerte erreichte (nach etwa 5 Minuten), wurde Adrenalin (Glaxo-Smith) über die Leber appliziert. Zunächst wurde Adrenalin in einer Dosis von 1,6 mg/kg appliziert. Diese Dosis wurde, wenn nötig, erhöht. Die maximale Herzfunktion wurde definiert als das Stadium kurz vor Beginn von Herzrhythmusstörungen als ein Surrogat für eine globale kardiale Dekompensation

2.7 Statistische Auswertung

Für eine zufallskritische Absicherung der beobachteten Werte ist die Anwendung statistischer Testverfahren unerlässlich. Die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede wurde mittels Kruskal-Wallis Test und anschließender Mann Whitney U post-Hoc Analyse durchgeführt. Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem P-Wert unter 0,05 ($P < 0,05$) wurde als signifikant gewertet, Unterschiede mit einem P-Wert gleich bzw. über 0,05 wurden dementsprechend als nicht signifikant

gewertet (n.s.). Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS Version 12.0 durchgeführt. Alle Daten der vorliegenden Doktorarbeit werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) (*englisch: „standard error of the mean“*) angegeben.