

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Tiere, Haltung, Diät**

In die Untersuchung wurden 28 ein bis zwei Jahre alte weibliche Beagle Hunde eingeschlossen, die über die Tierlaboratorien der Humboldt-Universität Berlin bezogen wurden. Die Tiere wurden entsprechend ihres sozialen Verhaltens und der Akzeptanz gegenüber kleineren experimentellen Eingriffen, wie z.B. die Anlage eines Blasenkatheters, ausgewählt. Die Hunde wogen im Durchschnitt  $13 \pm 0,5$  kg. Die Tierversuche wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales (AZ G0424/99) genehmigt.

Die Untersuchung wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Bo 1755/1) gefördert und durch universitäre Forschungsförderungsmittel unterstützt. Ausserdem standen der AG Experimentelle Anästhesie zwei ForschungsAiP zur Verfügung, die durch die Charité gefördert wurden.

Der Allgemeinzustand, die Nahrungsaufnahme, Körpergewicht und -temperatur der Hunde wurden täglich überwacht und protokolliert. Die Hunde wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten: am Tage durften sie sich frei im Auslauf bewegen, wurden täglich zu einem Hundespaziergang ausgeführt und nachts zu zweit oder einzeln in  $12 \text{ m}^2$  großen Boxen gehalten. Einmal täglich (14:00 Uhr) wurden die Hunde gefüttert. Sie erhielten Dosenfutter, gekochten Reis und hatten jederzeit Zugang zu Wasser, wenn sie nicht für ein Experiment vorgesehen waren. Fünf Tage vor einem Versuch bekamen die Tiere eine standardisierte Diät, um eine konstante Salz- und Wasseraufnahme zu gewährleisten, wie sie für einen vergleichbaren Stimulationsgrad des RAAS wichtig ist. Das tägliche Futter bestand dann aus 58 g/kg KG Reis, 12 g/kg KG Fleisch, 3,55 mmol/kg KG Kalium, 2,5 mmol/kg KG Natrium und 91 ml/kg KG Wasser. Diese Diät entspricht einer normalen Ernährung mit mittlerer Salzzufuhr und hat einen Nährwert von 277 kJ/kg KG. Darüber hinaus hatten die Hunde keinen Zugang zu Wasser oder Nahrung. Bei Läufigkeit der Hündinnen wurden keine Versuche durchgeführt.

### 3.2 Vorbereitung, Instrumentierung und Messung

Nach zwei bis drei Wochen Eingewöhnungszeit wurde mit dem Training der Tiere begonnen. Sie wurden daran gewöhnt, für mehrere Stunden auf der Seite zu liegen. Außerdem lernten sie das Labor und die beteiligten Untersucher/innen kennen. Kleinere experimentelle Vorgänge, wie das Legen eines Blasenkatheters und die Anlage der arteriellen und venösen Zugänge wurden in diese Trainingsphasen eingeschlossen. So konnten wir den Stressfaktor während der eigentlichen Versuche für die Tiere so gering wie möglich halten. Tolerierten die Tiere die Manipulationen nach 3-4 Wochen Training, wurden sie in das Protokoll aufgenommen.

Mindestens sieben Tage vor den Narkoseversuchen wurde den Tieren 60 ml venöses Blut entnommen (Punktion einer Vorderpfotenvene) und direkt in einen mit einem Stabilisator [enthält: 63 ml LCPDA-1-Stabilisator (26,3 g Natriumcitrat, 3,27 g Zitronensäure, 31,9 g Glukose, 2,51 g Natriumdihydrogenphosphat auf 1000 ml Aqua dest)] gefüllten Frischblutbeutel (BIOPACK® CPDA-1, NPBI, Emmer Compascuum, Niederlande) entnommen und bei 4-6 °C im Kühlschrank aufbewahrt. So wurde der durch die Probenentnahmen bedingte Blutverlust vor der geplanten Hämorrhagie ausgeglichen und einer versuchsabhängigen Aktivierung hormoneller Regulationsvorgänge infolge dieses Blutverlustes vorgebeugt. Der Abstand zwischen den Versuchen an einem Hund betrug mindestens 14 Tage.

Einen Tag vor dem Versuch wurden die Hunde in der Leistenbeuge und am Hals rasiert. Am Versuchstag wurde vor Versuchsbeginn die rektale Temperatur gemessen und nach Anlage des Blasenkatheters die Blase entleert und das Körpergewicht bestimmt. Danach wurde ein venöser Zugang in der V. cubitalis des Vorderlaufs platziert und eine Kreatinininfusion zur Bestimmung der exogene Kreatininclearance gestartet (Aufsättigungsdosis 1,4 g Kreatinin in 30 min = 46,7 mg/min und anschließende Erhaltungsdosis von 4,7 mg/min, resultierende Plasmakreatininkonzentration etwa 9 mg/dl). Die Plasmakreatininkonzentration und die Urinkreatininkonzentration wurden am Ende jeder Versuchsperiode bestimmt und mit der allgemeinen Clearanceformel die GFR für den entsprechenden Zeitraum geschätzt.

Zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Druckes und für die Blutentnahmen wurde perkutan ein Aortenkatheter über die A. femoralis platziert. Hierzu wurde nach

Desinfektion und steriler Abdeckung die Punktionsstelle lokal mit Xylocain 1 % 2 ml (Braun Melsungen, D) anästhesiert und anschliessend mittels Seldinger-Technik ein 20 cm langer PVC-Katheter (Ohmeda GmbH, Erlangen, D) mit einem Aussendurchmesser von 0,8 mm über die A. femoralis vorgeschoben, so dass die Katheterspitze im Bereich der Aorta abdominalis zu liegen kam. Die arterielle Blutdruckmessung erfolgte mit präkalibrierten Einmaldruckwandlern (Viggo Spectramed, ABOC, Health Care Company, Düsseldorf, D) aus deren arteriellem Drucksignal die Herzfrequenz (Hf) ermittelt wurde (Monitor: Danica, Dialogue 2000 Elektronik, DK).

Die V. jugularis externa dextra wurde nach Lokalanästhesie (Xylocain 1 %) punktiert und mit der Seldingertechnik eine Schleuse mit Sideport (Arrow, Av. Internat., Reading, UK) für den Thermodilutionskatheter (pulmonalarterieller Katheter) platziert. In die V. jugularis externa sinistra wurde eine weitere Schleuse für den Blutentzug gelegt. Durch die liegende Schleuse auf der rechten Seite wurde der 5F-Thermodilutionskatheter (Swan-Ganz<sup>®</sup>, 95-132-F, Fa. Baxter Healthcare Corporation, Unterschleißheim, D) unter Kontrolle der Druckkurve in die Pulmonalarterie eingeschwenkt, bis die Verschlussposition erreicht war. Zur Bestimmung des sogenannten „wedge“-Druckes wurde der Ballon des pulmonalarteriellen Katheters mit 0,7 ml Luft aufgeblasen, bis eine typische PCWP (pulmonary capillary wedge pressure)-Kurve sichtbar wurde (s. Abbildung 6). Als PCWP Wert wurde der nach 20 s Wartezeit am Monitor angezeigte, pulmonalarterielle diastolische Druck notiert und später zur Berechnung des pulmonalen Gefäßwiderstandes herangezogen.

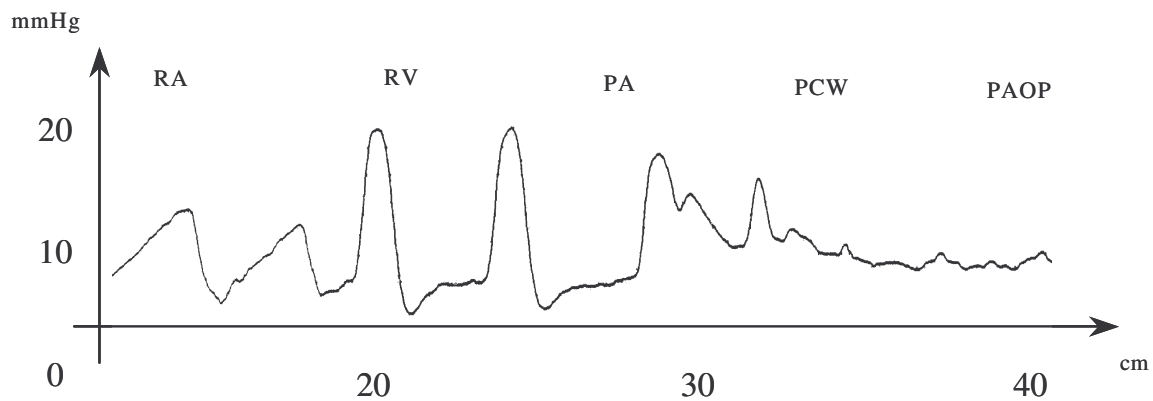


Abbildung 6: Druckverlauf beim Einschwennen eines pulmonalarteriellen Katheters (repräsentatives Einzelbeispiel) (Abszisse (cm) = Einführtiefe des Katheters von der Punktionsstelle, Ordinate (mmHg) = intravasaler Druck, RA = rechtes Atrium, RV = rechter Ventrikel, PA = Pulmonalarterie, PCW = pulmonalkapilläre Wegdeposition, PAOP = pulmonalarterieller Okklusionsdruck)

Der Ballon am pulmonalarteriellen Katheter wurde unmittelbar nach jeder Messung wieder entleert, so dass das Herzzeitvolumen (HzV) gemessen werden konnte. Dabei wurde pro Messung 5 ml kalte, sterile Glucoselösung in den rechten Vorhof injiziert und mit Hilfe der Computersoftware das Herzzeitvolumen berechnet (Vigilance<sup>®</sup>, Baxter Healthcare Corporation, Irvine, USA). Bei der HZV Bestimmung wurden jeweils fünf Messungen vorgenommen, der höchste und niedrigste Wert verworfen und die drei verbleibenden Werte gemittelt, um atmungsbedingte Schwankungen des HZV möglichst gut auszugleichen. An der Katheterspitze wurde über einen Druckaufnehmer kontinuierlich die pulmonalarterielle Druckkurve aufgenommen. Über den proximalen Injektionseingang, der im rechten Vorhof oder in der Vena cava superior lag, wurde die venöse Druckkurve aufgezeichnet, deren Mitteldruck wir als zentralen Venendruck (ZVD) ins Protokoll aufnahmen. Die Höhe der Druckaufnehmer über Tischniveau lag bei 10,5 cm, dieser Wert wurde vor jedem Versuch kontrolliert und entspricht dem Vorhofniveau des liegenden Hundes.

Die hämodynamischen Parameter (Herzfrequenz, arterielle, pulmonalarterielle und zentralvenöse Druckkurve) wurden kontinuierlich auf dem Monitor dargestellt und zusätzlich als Mittelwert alle 20 s auf einem Computer gespeichert. Aus diesen Daten wurden dann die Mittelwerte über 1 min, 20 min und 60 min berechnet zur Überprüfung der an den Messzeitpunkten abgelesenen Werte. Bei den

Narkoseversuchen wurden die Einstellungen am Beatmungsgerät (Atemfrequenz, Atemzugvolumen, Atemminutenvolumen und mittlerer Atemwegsdruck) und die Narkosegaskonzentration, die inspiratorische Sauerstoffkonzentration und die expiratorische Kohlendioxidkonzentration konstant gehalten und die Werte am Ende der Messperioden im Versuchsprotokoll notiert.

### **3.3 Experimentelle Protokolle**

Insgesamt wurden an 28 Hunden 112 jeweils etwa vier Stunden dauernde Experimente durchgeführt, wobei 10 Hunde für die Protokolle 1-4 und jeweils 6 Hunde für die Protokolle 5-16 verwendet wurden. Die Protokolle am wachen Hund (Protokoll 1-4) wurden an 10 Tiere durchgeführt, da unter Wachbedingungen die interindividuelle Variabilität größer ist als unter Allgemeinanästhesie. In die Anästhesieprotokolle wurden jeweils 6 Hunde eingeschlossen, da dies mit 80% Power das Minimum dessen darstellt, was zum Erreichen einer statistisch signifikanten Aussage entsprechend unserer Fallzahlberechnung nötig ist. So wurde eine unnötig hohe Tierzahl vermieden.

#### **3.3.1 Wache Hunde, Angiotensin II- und/oder Endothelin-A Rezeptorblockade (Protokoll 1-4)**

Die Hunde (ohne Narkose = ohneN) wurden den folgenden vier Protokollen zufällig zugeordnet (Abbildung 7):

1. Kontrollgruppe (ohneN)
2. Angiotensin II Rezeptorblockade ( $AT_1B$  ohneN)
3. Endothelin-A Rezeptorblockade ( $ET_A B$  ohneN)
4. Doppelblockade ( $AT_1 B + ET_A B$  ohneN)

##### Protokoll 1: Kontrollgruppe (ohne Narkose=ohneN)

Nach der oben beschriebenen Vorbereitung (Blasenkatheter, Punktionen von Arterie und Venen) und hatten die Hunde eine Ruhephase von 30 min. Daran schloss sich eine einstündige Beobachtungszeit (Kontrolle) an, an deren Ende alle hämodynamischen und renalen Parameter gemessen, sowie alle unten genannten Plasmawerte und Blutgasanalysen entnommen wurden. Anschließend wurde 20ml/kg KG Blut innerhalb von 5 min über die Schleuse entnommen und in einem

Frischblutbeutel (BIOPACK<sup>®</sup> CPDA-1, NPBI, Emmer Compascuum, NL) für die Retransfusion gesammelt. Nach der Hämorrhagie schloss sich eine weitere Beobachtungsperiode von 60 min an, in der 5 (5postH) und 60 (60postH) Minuten nach Hämorrhagie alle hämodynamischen Messungen wiederholt wurden. Es wurden zu diesen Zeitpunkten Blutentnahmen für Blutgasanalysen durchgeführt und die Plasmakonzentrationen der Hormone Angiotensin II, ADH, Adrenalin und Noradrenalin 5 min nach Hämorrhagie und zusätzlich PRA, PAC, Endothelin und ANP 60 min nach Hämorrhagie bestimmt. Am Ende der 60 min wurden alle renalen Parameter bestimmt. Im Anschluss an die Hämorrhagiephase wurde den Tieren das vorher entnommene Blut innerhalb von fünf Minuten retransfundiert. Es schloss sich eine 60 min Observationsperiode an (Retransfusion), an deren Ende wiederum alle Messungen vorgenommen wurden.

#### Protokoll 2: Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B ohneN)

Der prinzipielle Ablauf entspricht dem der Kontrollgruppe (ohneN). In der Ruhephase vor dem Versuchsbeginn wurde die kontinuierliche intravenöse Gabe des selektiven Angiotensin II (AT<sub>1</sub>) Rezeptorantagonisten (Losartan<sup>®</sup>, Merck Reseach Lab, Rahway, NJ, USA) mit 100 µg·kg KG<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> begonnen und bis zum Ende des Experiments fortgesetzt. Diese Dosierung wurde in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe erarbeitet (Krebs et al. 1999). Sie beträgt 100 µg·kg KG<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> und inhibiert die hypertensive Wirkung bei intravenöse Gabe von 4000ng Ang I bzw. von 1000ng AngII. Die adäquate Blockade der AT<sub>1</sub> Rezeptoren wurde jeweils am Ende der Versuche mit einer Gabe von 1000 ng Angiotensin II i.v. getestet, wobei sich keine Blutdruckreaktion zeigte.

#### Protokoll 3: Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B ohneN)

Der allgemeine Ablauf entspricht wiederum dem der Kontrollgruppe (wach). Zusätzlich wurde der selektive ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist ABT-627 (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) als Bolus (1 mg/kg KG) 30 min vor dem Versuchsbeginn i.v. verabreicht. Es schloss sich eine kontinuierliche Infusion von 0.01 µg·kg KG<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> i.v. an. Die adäquate Infusionsrate wurde in vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe erarbeitet (Francis et al. 2004).

#### Protokoll 4: Doppelblockade (AT<sub>1</sub>B+ET<sub>A</sub>B ohneN)

Der Ablauf des Protokolls entspricht dem der Kontrollgruppe (ohneN). Zusätzlich wurden sowohl der Angiotensin II- als auch der Endothelin-A Rezeptorantagonist intravenös in den Dosierungen der Protokolle 2 und 3 simultan appliziert.

### **3.3.2 Isofluran/Lachgas anästhesierte Hunde, Angiotensin II- und/oder Endothelin-A Rezeptorblockade (Protokoll 5-8)**

Die Hunde wurden den folgenden Protokollen in zufälliger Reihenfolge zugeordnet (Abbildung 8):

5. Kontrollgruppe (Iso/N<sub>2</sub>O)
6. Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B Iso/N<sub>2</sub>O)
7. Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B Iso/N<sub>2</sub>O)
8. Doppelblockade (AT<sub>1</sub>B+ET<sub>A</sub>B Iso/N<sub>2</sub>O)

#### Protokoll 5: Kontrollgruppe (Iso/N<sub>2</sub>O)

Nach den in Kapitel 2.2 beschriebenen Vorbereitungen hatten die Hunde eine Ruhephase von 30 min. Daran schloss sich eine 30minütige Periode (wach) an, an deren Ende alle hämodynamischen Messungen, Harnvolumenmessung und Blutentnahmen erfolgten. Anschließend wurde die Narkose mit 8-9 mg/kg KG Propofol (Disoprivan<sup>®</sup> 1%, AstraZeneca GmbH, Wedel, D) eingeleitet, die Tiere je nach Körpergröße mit einem Woodbridge-Tubus (34-36 Charrier) intubiert und maschinell beatmet (Physioflex, Dräger Medical, Lübeck, D). Die empfohlene Dosierung für Propofol als Einleitungsmedikament bei nicht-prämedizierten Hunden wird in der Literatur mit 6,5-7 mg/kg angegeben (Bufalari et al. 1998), wobei in der Veterinärmedizin die Tiere selten intubiert werden und mit dieser Dosierung die Spontanatmung erhalten bleibt. In unseren Versuchen verwendeten wir 8-9mg/kg als Einleitungs-dosis, da die Intubation in adäquater Narkosetiefe durchgeführt werden sollte. Die Atemfrequenz wurde dann auf 12-14/min und das Atemzugvolumen so eingestellt, dass der arterielle Kohlendioxidpartialdruck einer Normoventilation entspricht und zwischen 35 und 40 mmHg (Tabelle 23) lag. Die Narkose wurde mit 1,2 Vol% Isofluran (end-expiratorisch) aufrechterhalten, was beim Hund im Gemisch mit 70% Lachgas und 30% Sauerstoff 1,0 MAC (Cullen 1986) entspricht. Zur Verifizierung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde den Hunden einmal pro Versuchsstunde eine Schwanzklemme angelegt (Eger et al. 1965a). Außerdem

tolerierten die Tiere Manipulation am Tubus und an der Harnblase, zwei Stimuli, die bei unzureichender Narkosetiefe zu Wachreaktionen führen würden. Da die Hunde keine Muskelrelaxantien erhielten, wurden unbemerkte Wachreaktionen vermieden. Nach einer einstündigen Narkosephase wurde den Tieren 20 ml/kg KG Blut entzogen. Der folgende Verlauf (post Hämorrhagie und Retransfusion) und die Messzeitpunkte entsprechen denen der Kontrollgruppe (ohne Narkose). Am Ende wurde die Narkose in üblicher Weise (Beendigung der Narkosegaszufuhr und Applikation von reinem Sauerstoff) ausgeleitet und der Hund bei guten Schutzreflexen und suffizienter Spontanatmung extubiert.

#### Protokoll 6: Angiotensin II Rezeptorblockade ( $AT_1B$ Iso/ $N_2O$ )

Der Verlauf der Experimente entspricht dem der Kontrollgruppe (Iso/ $N_2O$ ). Während der Ruhephase nach der Punktion erhielten die Hunde den Angiotensin II Rezeptorantagonisten entsprechend Protokoll 2.

#### Protokoll 7: Endothelin-A Rezeptorblockade ( $ET_A B$ Iso/ $N_2O$ )

Der Verlauf der Experimente entspricht dem der Kontrollgruppe (Iso/ $N_2O$ ). Während der Ruhephase nach der Punktion erhielten die Hunde den Endothelin-A Rezeptorantagonisten entsprechend Protokoll 3.

#### Protokoll 8: Doppelblockade ( $AT_1 B + ET_A B$ Iso/ $N_2O$ )

Der Verlauf der Experimente entspricht dem der Kontrollgruppe (Iso/ $N_2O$ ). Während der Ruhephase nach der Punktion erhielten die Hunde den Angiotensin II und Endothelin-A Rezeptorantagonisten entsprechend Protokoll 4.



## Graphische Übersicht der Protokolle 1 - 4

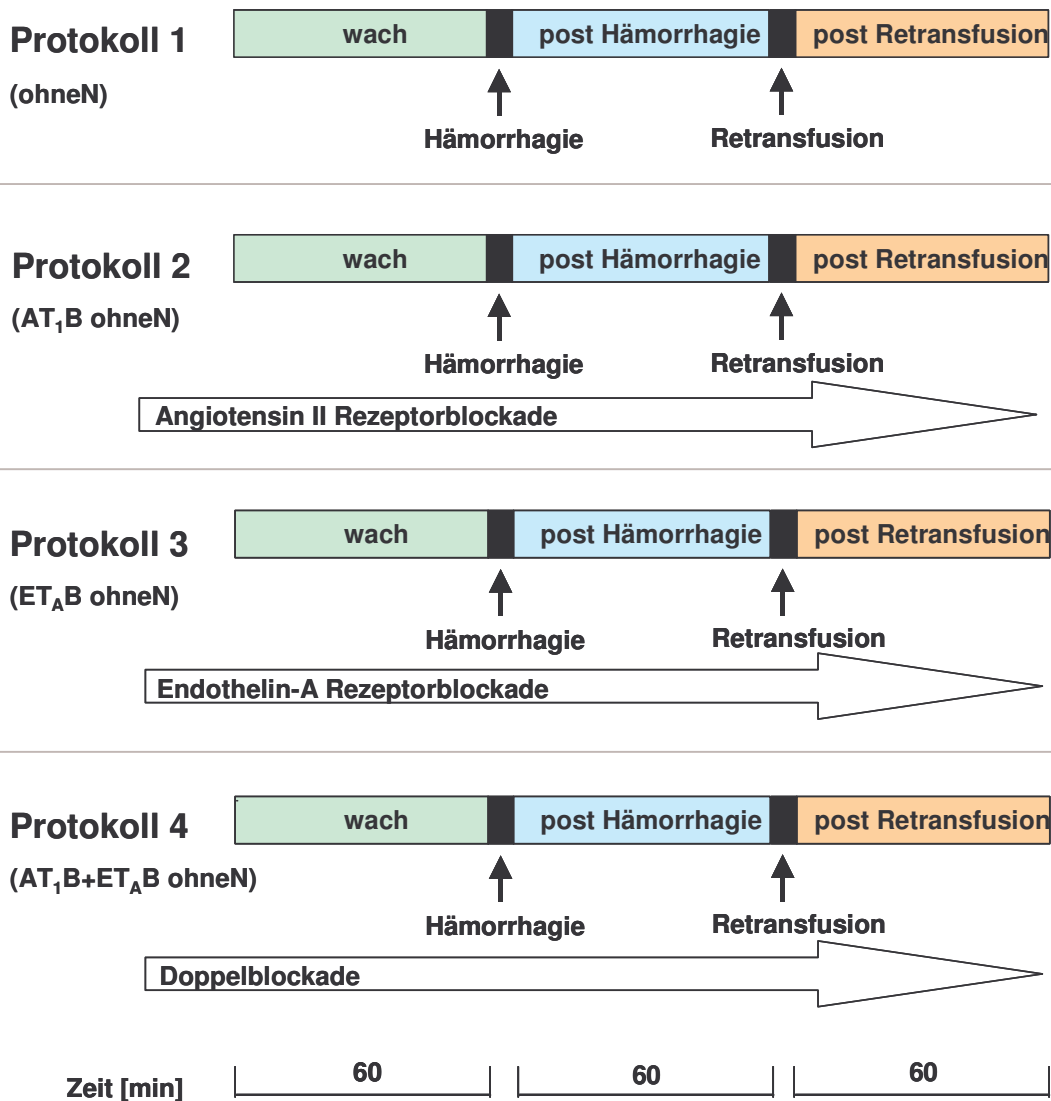


Abbildung 7: Graphische Übersicht des Versuchsablaufs der Protokolle 1-4. Zehn Hunde durchliefen alle vier Protokolle. Ohne Narkose (ohneN), Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B), Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B).

## Graphische Übersicht der Protokolle 5 - 8

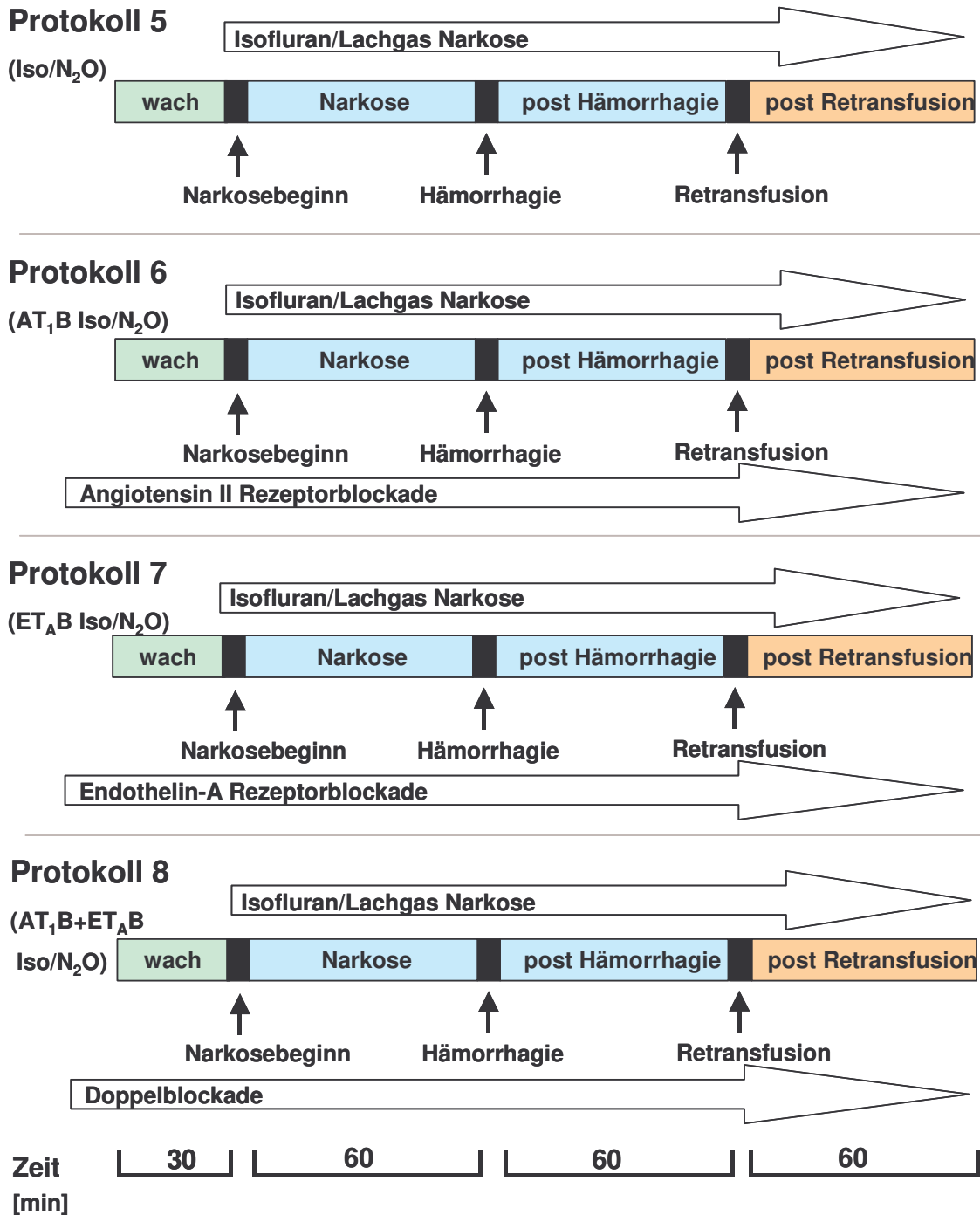


Abbildung 8: Graphische Übersicht des Versuchsablaufs der Protokolle 5-8. Sechs Hunde durchliefen alle vier Protokolle. Isofluran (Iso), Lachgas (N<sub>2</sub>O), Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B), Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B).

### **3.3.3 Isofluran/Remifentanil (Iso/Remi) anästhesierte Hunde, Angiotensin II und/oder Endothelin-A Rezeptorblockade (Protokoll 9-12)**

Die Hunde wurden den folgenden Protokollen in zufälliger Reihenfolge zugeordnet (Abbildung 9):

9. Kontrollgruppe (Iso/Remi)
10. Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B Iso/Remi)
11. Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B Iso/Remi)
12. Doppelblockade (AT<sub>1</sub>B+ET<sub>A</sub>B Iso/Remi)

#### Protokoll 9: Kontrollgruppe (Iso/Remi)

Der Verlauf des Experiments bis zur Narkoseeinleitung entspricht dem des Protokolls 5. Zur Erhaltung der Narkose erhielten die Hunde in diesem und den folgenden Protokollen (10-12) Isofluran 0,7-0,8 Vol % endexpiratorisch, 30% Sauerstoff und Remifentanil (0,5 µg·kg KG<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) (Hoke et al. 1997) intravenös. Remifentanil in dieser Dosierung reduziert den MAC von Enfluran beim Hund um 40-50% (Michelsen et al. 1996) und beim Menschen den MAC von Isofluran um etwa 50% (Lang et al. 1996). Zur Reduktion des MAC von Isofluran beim Hund gibt es keinen Literaturhinweis. So wurde ein 50% Reduktion des MAC durch die Remifentanilgabe angenommen und zur Verifizierung einer ausreichenden Narkosetiefe regelmäßig die Schwanzklemme angesetzt. Der Versuchsablauf und die gemessenen Parameter entsprechen dem Protokoll 5.

#### Protokoll 10: Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B Iso/Remi)

Der Ablauf der Experimente entspricht dem Protokoll 9, zusätzlich wurde der AT<sub>1</sub> Rezeptorantagonist Losartan verabreicht (siehe Protokoll 2).

#### Protokoll 11: Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B Iso/Remi)

Der Ablauf der Experimente entspricht dem Protokoll 9, außerdem wurde der Endothelin-A Rezeptor blockiert (siehe Protokoll 3).

#### Protokoll 12: Doppelblockade (AT<sub>1</sub>B+ET<sub>A</sub>B Iso/Remi)

Der Ablauf der Experimente entspricht dem Protokoll 9, zusätzlich wurden beide Rezeptorantagonisten infundiert (siehe Protokoll 4).

### **3.3.4 Xenon/Remifentanil anästhesierte Hunde, Angiotensin II- und/oder Endothelin-A Rezeptorblockade (Protokoll 13-16)**

Die Hunde wurden den folgenden Protokollen in zufälliger Reihenfolge zugeordnet (Abbildung 10):

13. Kontrollgruppe (Xe/Remi)
14. Angiotensin II Rezeptorblockade ( $AT_1B$  Xe/Remi)
15. Endothelin-A Rezeptorblockade ( $ET_A B$  Xe/Remi)
16. Doppelblockade ( $AT_1 B + ET_A B$  Xe/Remi)

#### Protokoll 13: Kontrollgruppe (Xe/Remi)

Der Verlauf des Experiments bis zur Narkoseeinleitung entspricht dem des Protokoll 5. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten die Hunde in diesem und in den folgenden Protokollen (13-16) Xenon 70 Vol%, 30% Sauerstoff und Remifentanil ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg} \text{ KG}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) intravenös. Der MAC von Xenon beim Hund beträgt 120 Vol% (Eger et al. 1965). Unter der Annahme, dass Remifentanil auch hier den MAC reduziert, haben wir zum einen den maximal möglichen Xenonanteil und zum anderen die gleiche Remifentanildosierung, wie im Isofluran/Remifentanilprotokoll, gewählt. Zur Verifizierung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde regelmäßig die Schwanzklemme angesetzt. Der Versuchsablauf und gemessenen Parameter entsprechen dem Protokoll 5.

#### Protokoll 14: Angiotensin II Rezeptorblockade ( $AT_1 B$ Xe/Remi)

Der Ablauf der Experimente entspricht dem Protokoll 13. Zusätzlich wurde der  $AT_1$  Rezeptor mit Losartan antagonisiert (siehe Protokoll 2).

#### Protokoll 15: Endothelin-A Rezeptorblockade ( $ET_A B$ Xe/Remi)

Der Ablauf der Experimente entspricht dem Protokoll 13. Außerdem wurde der Endothelin-A Rezeptor blockiert (siehe Protokoll 3).

#### Protokoll 16: Doppelblockade ( $AT_1 B + ET_A B$ Xe/Remi)

Der Ablauf der Experimente entspricht dem Protokoll 13. Zusätzlich wurden beide Rezeptorantagonisten infundiert (siehe Protokoll 4).

## Graphische Übersicht der Protokolle 9 - 12

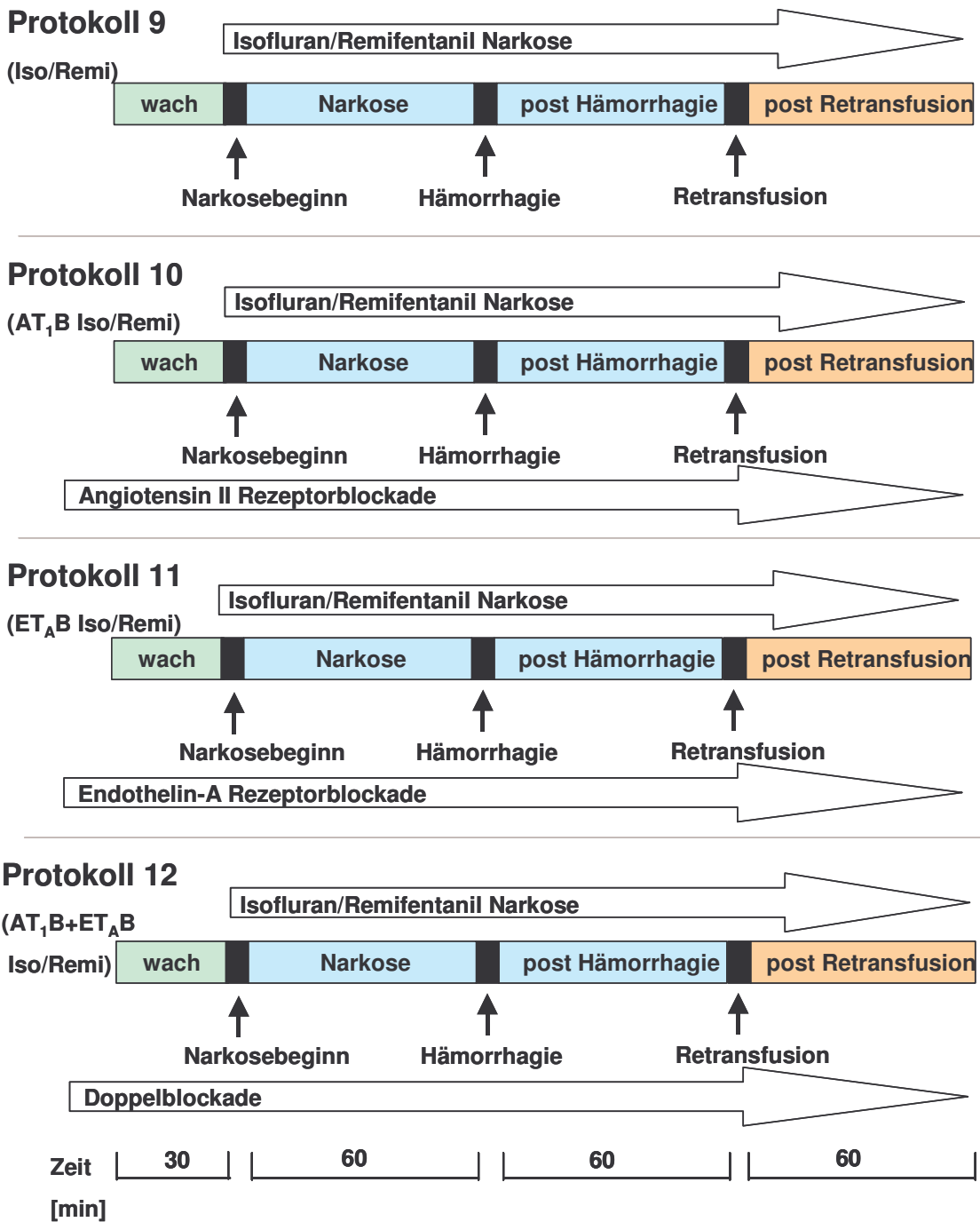


Abbildung 9: Graphische Übersicht des Versuchsablaufs der Protokolle 9-12. Sechs Hunde durchliefen alle vier Protokolle. Isofluran (Iso), Remifentanyl (Remi), Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B), Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B).

## Graphische Übersicht der Protokolle 13 - 16

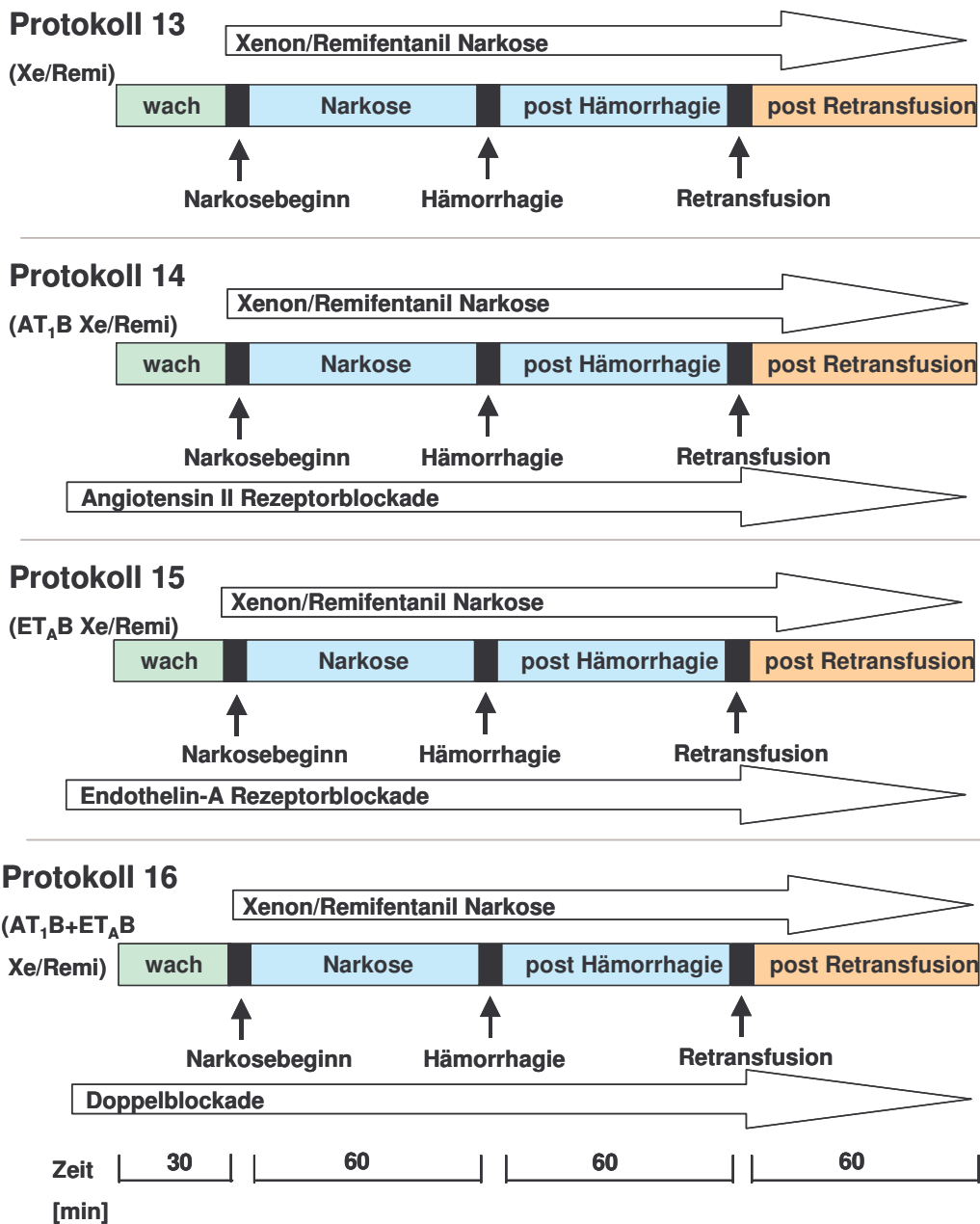


Abbildung 10: Graphische Übersicht des Versuchsablaufs der Protokolle 13-16. Sechs Hunde durchliefen alle vier Protokolle. Xenon (Xe), Remifentanyl (Remi), Angiotensin II Rezeptorblockade (AT<sub>1</sub>B), Endothelin-A Rezeptorblockade (ET<sub>A</sub>B).

### 3.4 Laboranalytik

#### Elektrolyte, Kreatinin, Osmolarität und Blutgasanalysen

Die Messung der Natrium-, Kalium- und Kreatininkonzentrationen und der Osmolarität wurde in den Blut- und den Urinproben vorgenommen. Dabei wurden die Natrium- und Kaliumkonzentrationen mit einem Flammenphotometer (AFM 5052, Eppendorf GmbH, Hamburg, D) bestimmt. Kreatinin wurde auf der Basis der photometrischen Jaffé-Reaktion mit Pikrinsäure unter Anwendung eines kinetischen Tests bestimmt. (Creatinin Analyzer 2, Beckmann Instruments, USA). Die Osmolaritätsmessung erfolgte nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung (Kryoskopie) mit einem automatischen Mikroosmometer (Osmometer 2, Fa. Roebling, Berlin, D).

Am Ende jeder Versuchsperiode wurden sowohl arterielle als auch gemischt-venöse Blutgasanalysen durchgeführt. Es wurden der pH-Wert, sowie der O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck mit einem Blutgasanalysator (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, DK) bestimmt und das Standardbikarbonat und der Basenüberschuss nach Standardformeln vom Gerät berechnet. Die O<sub>2</sub>-Sättigung wurde mit einem auf Hundeblood geeichten Hemoximeter (OSM 3, Radiometer Kopenhagen, DK) bestimmt.

#### Hormonanalytik

Alle Proben wurden sofort nach Abnahme im Eisbad gelagert und anschließend in einer Kühlzentrifuge (Varifuge RF, Heraeus Holding GmbH, D) bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde dann bis zur Analyse bei –80 °C tiefgefroren.

Da die direkte Bestimmung von Renin in Hundeplasma nicht möglich ist, haben wir als Maß für die Reninkonzentration die Plasmareninaktivität (PRA) mittels Radioimmunoassay- (RIA) Kits (New England Nuclear, North Billerica, MA, USA; intra-assay Variationskoeffizient 11 %, inter-assay Variationskoeffizient 8,4 %) quantitativ bestimmt. Die PRA hat die Dimension ng AngI/ml/h.

Die Konzentration von Angiotensin II (AngII) wurde mittels RIA (Kit von Fa. Euro-Diagnostica B.V., intra-assay Variation 3,9 - 8,6 %, inter-assay Variation 10,6 %) im Plasma gemessen. Die Angabe erfolgt als pg/ml.



Die Plasmaaldosteronkonzentration (PAC) wurde mittels Radioimmunoassay (Fa. Sorin, Biomedica, ALDO CTK-2R, Sorin Company, Saluggia, I; intra-assay Variationskoeffizient 9,1 %, inter-assay Variationskoeffizient 11,5 %) bestimmt. Diese wird in pg/ml angegeben.

Die Bestimmung der ADH- Konzentration im Plasma erfolgte radioimmunologisch (Kit der Biermann Company, Bad Nauheim, D; intra-assay Variation 8 %, inter-assay Variation 10,4 - 13,9 %) unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -ADH. Die Einheit wird mit pg/ml angegeben.

Zur Endothelinbestimmung wurde ein für Endothelin (1-21) spezifischer Sandwich-ELISA (BI20052, Biomedica, Wien, A; intra-assay Variation 4,5%, interassay Variation 6,9-7,6%) verwendet. (Details siehe Boemke et al. 2001)

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden mittels HPLC (high pressure liquid chromatography; Chromosystems, München, D) analysiert. (Details siehe Boemke et al. 1998)

### **3.5 Statistik**

Die statistische Auswertung wurde unter Benutzung des Computerprogramms NCSS durchgeführt. Zunächst wurden die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsperioden innerhalb jeden Protokolls und zwischen zeitgleichen Versuchsperioden mittels einer globalen Varianzanalyse (GLM ANOVA) auf Unterschiede getestet. Die Protokolle Isofluran/Lachgas und Isofluran/Remifentanil Narkose wurden ausserdem gegen Xenon/Remifentanil Narkose getestet. Ergaben sich hier signifikante Unterschiede, schloss sich für den entsprechenden Parameter eine Folgeanalyse in Form gepaarter t-Teste nach Student mit Bonferroni Korrektur an. Bei allen statistischen Tests wurde  $p < 0,05$  (\*) als Signifikanzniveau festgelegt (Schaffer 1986). Es werden jeweils arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) mitgeteilt.