

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Präparationen zur Isolierung und Perfusion der Rattenniere

Die Versuche erfolgten mit männlichen Wistar-Kyoto-Ratten, die ein Alter von 3-6 Monaten und ein Gewicht von 250-350 g erreicht hatten. Nach Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von Urethan (1,4 g/kg Körpergewicht) erfolgte die Eröffnung der Peritonealhöhle mit Hilfe eines Unterbauch-Medianschnittes, der Y-förmig bis zum Zwerchfellansatz beidseits fortgeführt wurde. Die dabei erscheinenden Darmschlingen wurden verlegt, so dass sich die Nieren, die infrarenale Aorta sowie Arteriae renales darstellten. Die linksseitige Niere sowie die dazugehörige Arteria renalis wurden dann vorsichtig stumpf freipräpariert und es erfolgte nun das Setzen einer Ligatur im infrarenalen Aortenbereich sowie an der Arteria renalis. Proximal der infrarenalen Ligatur wurde nun die Aorta durch eine Klemme verschlossen und anschließend distal der Ligatur mit Hilfe einer Mikroschere inzidiert. Durch die entstandene Öffnung wurde nun schließlich ein Polyethylenkatheter (Länge: 5,1 cm; Außendurchmesser: 1,1 mm; Innendurchmesser: 0,75 mm; Firma Baxter, Deutschland) in die Aorta eingeführt und die Ligatur um den Katheter geschlossen. Nach Lösung der Klemme erfolgte eine Injektion von 500 i.E. Heparin zur Verhinderung einer Mikrothrombosierung innerhalb des Nierengefäßbettes. Der Katheter wurde nun langsam mit geringem Druck in die Arteria renalis vorgeschoben und die zweite Ligatur geschlossen. Nun konnte das Präparat aus dem Retroperitonealraum herausgelöst und sofort an das im Folgenden beschriebene Perfusionssystem angeschlossen werden.

### 2.2 Verwendete Chemikalien

Alle Test- und Kontrollsubstanzen wurden in Form einer 100 µl-Bolusinjektion per Injektionsventil proximal der dauerperfundierten Niere appliziert. Alle diese Substanzen wurden täglich frisch aus einer konzentrierten tiefgefrorenen Stammlösung (10 mM) hergestellt. Die Verdünnung erfolgte dabei mit Tyrodelösung.

Folgende Substanzen wurden bei der Präparation der Rattenniere verwendet:

- Heparin (500 i.E.)
- Urethan (1,4 g pro Kilogramm Körpergewicht)

Beide Substanzen wurden wie auch die Bestandteile der Tyrodelösung (siehe Tabelle 5) von der Firma Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Es wurde mit folgenden Substanzen an der isoliert perfundierten Rattenniere gearbeitet:

- $\alpha,\beta$ -meATP (Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA))
- Ang II (Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA))
- Suramin (Research Biochemicals Inc., USA)
- PPADS (Research Biochemicals Inc., USA)
- NF023 (Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA))
- RB-2 (Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA))
- MRS 2179 (Merck Research Biochemicals Inc., USA)
- ATP $\gamma$ S (Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA))
- CPDPX (Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA))
- Ap<sub>7</sub>A
- Ap<sub>8</sub>A

Durch Prof. Dr. rer. nat. Jankowski und seine Mitarbeiter wurden Ap<sub>7</sub>A und Ap<sub>8</sub>A vor Gebrauch nach der Methode von Heidenreich (Heidenreich, Tepel et al. 1995) aufgereinigt.

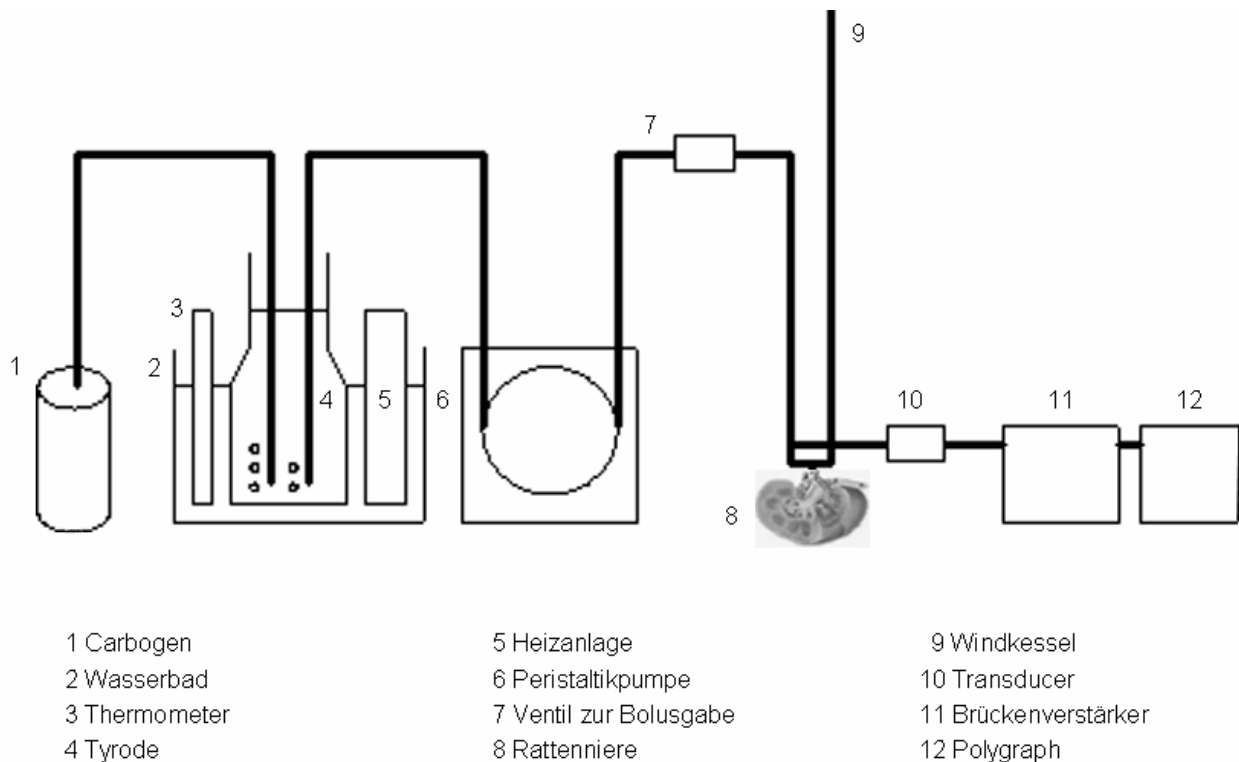
### 2.3 Das Nierenperfusionssystem

Das Perfusionssystem (Abbildung 3) entspricht in seinem Aufbau und seiner Funktionsweise weitgehend dem von Hofbauer et al. beschriebenen Schema (Hofbauer, Zschiedrich et al. 1973). Als Perfusat diente Tyrodelösung, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Tyrodelösung

Komponente	Konzentration (mmol/l)
NaCl	137
KCl	2,7
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1,1
NaHCO <sub>3</sub>	12
NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	0,42
Glucose	5,6

Die Lösung wurde in einem Wasserbad so erhitzt (Heizanlage: Firma Kottermann, Deutschland), daß sie bei Erreichen der isolierten Rattenniere, eine der physiologischen Körpertemperatur entsprechende Temperatur von 37°C aufwies. Das Perfusat wurde dabei zusätzlich mit 95% O<sub>2</sub> sowie 5% CO<sub>2</sub> begast. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Firma Ismatec, Schweiz) mit einem konstanten Volumenfluss von 8-9 ml pro Minute wurde die Perfusion der Niere erreicht. Zwischen Peristaltikpumpe und dem Nierenpräparat wurde ein Injektionsventil, mit einem Fassungsvermögen von 100 µl angebracht, das dazu diente, Testsubstanzen in die isolierte Rattenniere applizieren zu können. Über einen Gould-Drucktransducer (Statham-Element P23Gb, Firma Siemens, Deutschland) wurden die durch die getesteten Substanzen an den Nierengefäßen hervorgerufenen Effekte in Form von Änderungen des Perfusionsdruckes (mmHg) gemessen. Die Signale des Transducers wurden mit Hilfe eines Brückenverstärkers (Firma Hugo Sachs, Deutschland) intensiviert und mittels eines Polygraphen (Firma Rikadenki, Deutschland) dokumentiert.



**Abbildung 4: Aufbau des Perfusionssystems**

### 2.4 Äquilibration des Systems und Überprüfung auf Funktionstüchtigkeit

Nach dem Anbringen der Niere an das Perfusionssystem wurde zunächst mindestens 30 Minuten gewartet, damit sich in der Niere ein konstanter Basalperfusionsdruck aufbauen konnte. Der Basalperfusionsdruck ist der Druck, der sich nach einer gewissen Zeit bei konstantem Fluß einstellt. Vasokonstriktorische Effekte der applizierten Substanzen waren daher durch entsprechende Druckerhöhung besonders gut erkennbar. Zur Beurteilung der Funktionstüchtigkeit der Niere wurden am Anfang wie auch am Ende eines jeden Versuches vasoaktive Kontrollsubstanzen in Bolusform (100  $\mu$ l) injiziert: Angiotensin II (100 nmol/l),  $\alpha$ , $\beta$ -meATP (1  $\mu$ mol/l),  $A_{P_5A}$  (1  $\mu$ mol/l), Phenylephrine (1  $\mu$ mol/l). Fanden im Verlauf des Versuches Dauerperfusionen durch Antagonisten oder Agonisten statt, so wurden die entsprechenden Testsubstanzen vor, während sowie nach der Dauerperfusion ein weiteres Mal injiziert. Um artifizielle Reaktionen der Nierengefäße auszuschliessen, wurden Bolusapplikationen mit Tyrodelösung durchgeführt, die keine Änderung des Perfusionsdruckes zur Folge hatten.

### 2.5 Durchführung der Nierenversuche

#### 2.5.1 Erstellen von Dosiswirkungskurven der Testsubstanzen unter Dauerperfusion mit Tyrode

Beginnend mit der geringsten Konzentration von 0,1 pmol/l bis zu 100 nmol/l wurden in dekadisch-logarithmischen 5er Schritten Dosiswirkungskurven folgender Substanzen erstellt:  $\alpha,\beta$ -meATP, Ang II und  $Ap_7A$  sowie  $Ap_8A$ . Die Materialien wurden als 100  $\mu$ l-Bolus über ein Injektionsventil proximal der Niere eingegeben. In niedrigeren Konzentrationsbereichen (0,1 pmol/l bis 100 nmol/l) wurde zwischen den Applikationen jeweils fünf Minuten gewartet, damit die Substanzen ausgewaschen werden und sich somit nicht gegenseitig beeinflussen konnten. In höheren Konzentrationsbereichen (ab 100 nmol/l) betrug diese Spanne zwanzig Minuten. Dieses Vorgehen induzierte keine Desensibilisierung.

#### 2.5.2 Erstellen von Dosiswirkungskurven der Testsubstanzen unter Dauerperfusion mit Antagonisten

Um die für die Kontraktion verantwortlichen Rezeptoren ermitteln zu können, wurden Dauerperfusionsen mit 30  $\mu$ mol/l PPADS ( $P_{2X1}$ ,  $P_{2X2}$ ,  $P_{2Y1}$ ,  $P_{2Y4}$  und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorantagonist), 100  $\mu$ mol/l Suramin ( $P_{2X1}$ ,  $P_{2X2}$ ,  $P_{2Y1}$  und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorantagonist), 10  $\mu$ mol/l NF023 (Suraminderivat) und mit dem stärksten bekannten  $P_{2X}$ -Rezeptoragonisten 10  $\mu$ mol/l  $\alpha,\beta$ -meATP durchgeführt. Weiterhin wurden 10  $\mu$ mol/l MRS 2179 ( $P_{2Y1}$ -Rezeptorantagonist), 10  $\mu$ mol/l RB-2 ( $P_{2Y4}$  und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorantagonist), 10  $\mu$ mol/l ATP $\gamma$ S ( $P_{2Y2}$ -Rezeptoragonist) bzw. 10  $\mu$ mol/l CPDPX ( $A_1$ -Rezeptorantagonist) eingesetzt.

Das Nierenpräparat wurde dabei kontinuierlich mit den in der Tyrode gelösten Antagonisten, beziehungsweise Agonisten perfundiert. Es folgte eine Wartezeit von mindestens 30 Minuten um eine optimale Blockade der Rezeptoren zu erreichen. Anschließend wurden erneut Dosiswirkungskurven von  $Ap_7A$  und  $Ap_8A$  erstellt, die auch nach Beendigung der Dauerperfusion, das heißt nach Auswaschen der Antagonisten oder Agonisten noch einmal wiederholt wurden. Zur Überprüfung der Nierenfunktion sowie der Rezeptorbesetzung, erfolgte kontinuierlich eine Testinjektion von Angiotensin II (100 nmol/l), wobei dieses purinrezeptorunabhängig fungiert. Wichtig war dabei zu beachten, daß die vasokonstriktive Reaktion von Angiotensin II stets nicht signifikant unterschiedlich sein durfte. Bei signifikant unterschiedlichen Angiotensin II induzierten Perfusionsdruckänderungen wurde der Versuch nicht gewertet.

### 2.5.3 Desensitierungsversuche

Durch zeitlich eng aufeinander folgende Gaben von Dinukleosidpolyphosphaten, kommt es zu Desensitierungseffekten, die folgendermaßen untersucht wurden. Über eine einzelne Injektion wurde der maximale Kontraktionswert ermittelt. Im Anschluß daran wurden die Agonisten jeweils in einminütigen bis schließlich halbminütigen Abständen appliziert, bis die einzelnen Boli nachvollziehbar konstante Vasokonstriktionen zeigten. Zur Beobachtung der Abnahme des Desensitierungsgrades wurde die Dauer zwischen den Bolusgaben von 30 s auf 1, 2, 4, 8 und 16 min gesteigert, bis die dem Kontrollwert entsprechende maximale Vasokonstriktion wieder erreicht wurde.

### 2.6 Statistik

Die vasoaktiven Gefäßreaktionen wurden als Änderung des Perfusionsdruckes in mmHg registriert. Dargestellt wurden die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  mittlere Standardabweichung (SEM = standard error mean). Da die Ergebnisse der Dauerperfusionsexperimente mit  $\alpha$ , $\beta$ -meATP, PPADS, Suramin, NF023, RB-2, MRS 2179, ATP $\gamma$ S, CPDPX und Ang II Gruppen von unverbundenen Stichproben mit potentiell unterschiedlicher Standardabweichung darstellen, wurde für die statistischen Analysen der verteilungsunabhängige U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet. Als Nullhypothese ( $H_0$ ) wurde angenommen, daß die Perfusionsdruckmittelwerte der Testsubstanzen unter Dauerperfusion mit den Antagonisten den Perfusionsdruckmittelwerten der Testsubstanzen unter Tyrode entsprächen. Als Alternativhypothese ( $H_1$ ) wurde angenommen, daß unter der Dauerperfusion die Perfusionsdruckmittelwerte größer oder kleiner wären als unter Tyrode. Die unterschiedlichen Signifikanzen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests berechnet. Irrtumswahrscheinlichkeiten kleiner 0,05 wurden im entsprechenden Test als signifikant erachtet.