

3 **Material und Methoden**

Alle verwendeten Geräte und Pharmaka sind in einer Übersicht auf S. 42 mit der jeweiligen Herstellerfirma als Übersicht zusammengestellt.

3.1 **Versuchstiere**

Alle der in diesen Experimenten verwendeten AT₂-/*y*-Mäuse sowie deren Kontrollen stammen von Zuchtpaaren, die von Prof T. Inagami am Vanderbilt University Medical Center (Nashville TN) zur Verfügung gestellt wurden. Die Anzucht der verwendeten Versuchstiere erfolgte am MDC. In regelmäßigen Abständen wurde die genetische Homogenität der Stämme durch PCR von Schwanzgewebeproben (AG Dr. M. Bader, MDC) überprüft.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf Untersuchungen an ausschließlich männlichen Tieren, die in der Regel im Alter von 12-15 Wochen in die Versuchsserie eingingen. Abweichungen davon sowie besondere Vorbehandlungen bzw. Haltungsbedingungen sind zusammenfassend in Abb. 5 dargestellt. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter (SNIFF Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) mit einem Kochsalzanteil von 0,25 % und Trinkwasser. Die Mäuse wurden in klimatisierten Räumen untergebracht in denen ein standardisierter Tag-/Nacht-Wechsel gewährleistet war (Licht: 6-18 Uhr).

Die beschriebenen experimentellen Interventionen sind vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit/Fachbereich 5.2 unter der Zulassungsnummer TVVG 0042/01 genehmigt worden und entsprechen auch den international gültigen Standards der American Physiological Society.

Experiment Behandlung	Telemetrie	Nierenfunktionsmessung RBF, GFR, DDN	linksventrikuläre Druck-/ Volumenmessung	Simultanerfassung von Herzminutenvolumen und Blutdruck
1 Woche L- NAME	Vorbefund	12-15 Wo alte männl. Tiere, Gewicht: 25-30g		
3 Wochen L- NAME	männl. Tiere, Mindestgewicht 28g; Teilgruppe: 3. Wo L-NAME+ Valsartan		12-15 Wo alte männl. Tiere, Gewicht 25-30g	altersunabhängige männl., nicht vorbehandelte Tiere (nur WT), Mindestgewicht 28g
3 Wochen DOCA-Salz	Vorbefund (uninephrektomierte Tiere) + männl. Tiere nicht vorbehandelt; Teilgruppe: 3. Wo DOCA/Salz +GED per gavage Mindestgewicht 28g	12-15 Wo alte männl., nicht vorbehandelte Tiere, Gewicht 25-30g		altersunabhängige männl., uninephrektomierte Tiere (nur WT), Mindestgewicht 28g

Abb. 5: Alter, Körpergewicht und Vorbehandlung der in den Versuchsserien verwendeten Mäuse.

3.2 Protokoll 1: Implantation eines Telemetriesenders für die Erfassung von Blutdruck und Herzrate in der nichtnarkotisierten Maus

Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und dorsal auf einer Wärmeplatte fixiert. Als Zugangsgefäß für den am Sender befindlichen Meßkatheter ist dann die rechte A. carotis communis präpariert worden. Das Gefäß wurde zunächst isoliert und rostral nahe der Bifurkation von A. carotis externa und A. carotis interna abgebunden. Dabei mußte auf die Unversehrtheit des nahe an der Arterie verlaufenden N. Vagus geachtet werden. Im Anschluß wurde mit einer abgewinkelten Injektionsnadel ein Loch in die Gefäßwand gestochen und der Katheter eingeführt. Die Katheterspitze wurde ca. 1,5 cm bis in den Aortenbogen vorgeschoben und der Katheter im Gefäß eingebunden. Danach ist der Sender subcutan fixiert worden. Dazu wurde mit einer großen stumpfen Schere die Haut gelöst und eine Tasche am

Abdomen geformt, in die der Sender geschoben wurde. Für eine bessere Gleitfähigkeit des Senders wurde zuvor mit 0,9% NaCl gespült. Anschließend wurde die Wunde vernäht.

Nach erneutem Einsetzen der circadianen Rhythmik von Blutdruck und Herzrate, die als Zeichen einer wiederhergestellten Kreislaufregulation nach der Operation gewertet wurde, ist mit der eigentlichen Messung der Ausgangsdaten begonnen worden. In der Regel wurde nach 5-7 Tagen mit der Datenaquise begonnen.

3.3 Protokoll 2: Messung der Druck-Diu-/Natriurese sowie des renalen Blutflusses (RBF)

Die Messung der Druck-Diu-/Natriurese und des renalen Blutflusses (RBF) erfolgte im gleichen Versuchs-Setup. Es wurden 12-15 Wochen alte Tiere untersucht.

Präparation

Der Maus wurde zunächst in Abhängigkeit vom Körpergewicht $50\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (K) Ketavet (100mg/ml) i.p. injiziert. Einige Minuten später, nach oberflächlicher Sedierung der Maus, folgte die Injektion von $100\mu\text{g/g}$ K Inactin i.p.

Nach vollständiger Sedierung der Maus wurde das Abdomen ventral rasiert und das Tier auf einem Heiztisch dorsal liegend fixiert. Die Körpertemperatur wurde unter Kontrolle einer rektal platzierten Meßsonde während des gesamten Experimentes bei 36.8°C konstant gehalten. Aufgrund der durch die unnatürliche Lage erschwerten Spontanatmung sind alle Tiere tracheotomiert worden. Dazu wurde eine zu diesem Zweck abgestumpfte Injektionskanüle (1,2mm Innendurchmesser) in die Trachea eingeführt und eingebunden.

Die Messung des arteriellen Blutdruckes erfolgte über einen in die linke A. carotis eingeführten Polyethylen-Katheter, der im Vorfeld des Experimentes mit heparinisierte Kochsalzlösung (0.9%; 50IE/ml) gefüllt und an einen Druckwandler angeschlossen wurde. Auf diese Weise konnten während des gesamten Experimentes die Herzrate, der systolische und diastolische und der aus diesen beiden Parametern kalkulierte mittlere arterielle Blutdruck registriert werden. Die Präparation erfolgte wie in Protokoll 1.

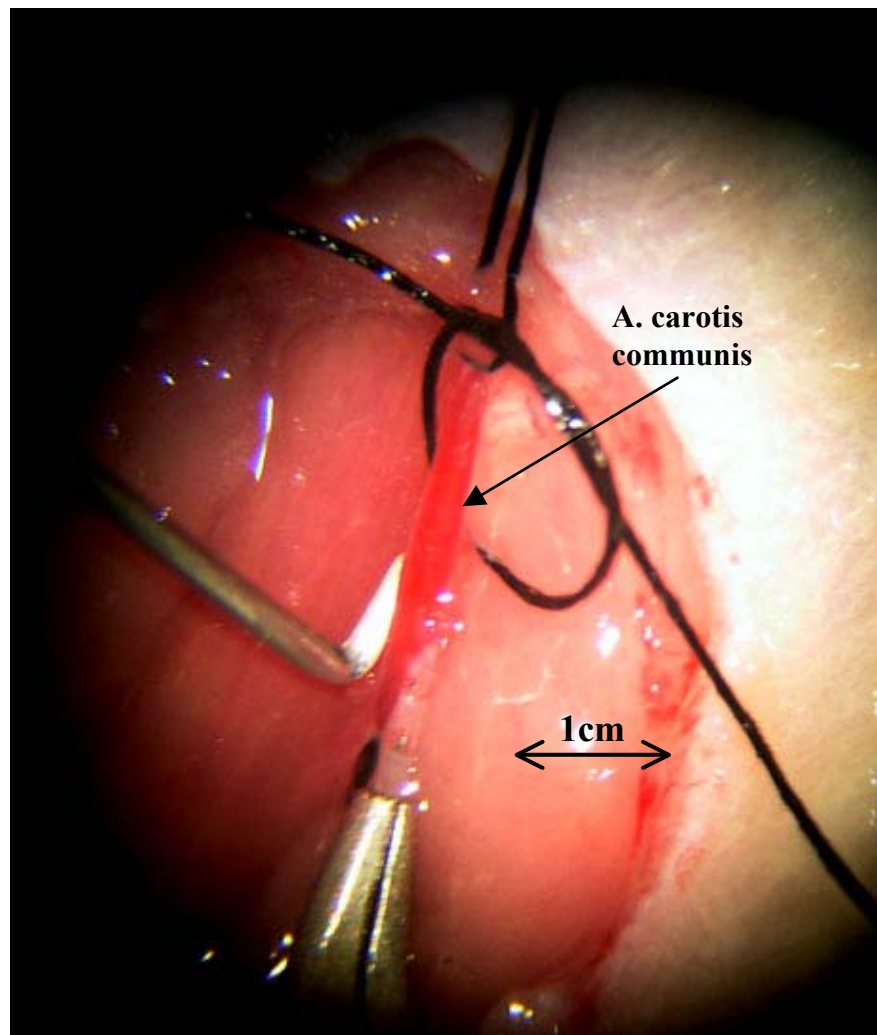


Abb. 6: Katheterisierung der *Arteria carotis communis*. Das Gefäß wurde rostral abgebunden und caudal ohne Knoten gespannt. Der in der Mitte des Gefäßes locker geschlungene Knoten dient dem späteren Einbinden des Katheters in das Gefäß. Die Kanulierung erfolgt mit einer abgewinkelten Injektionskanülenspitze.

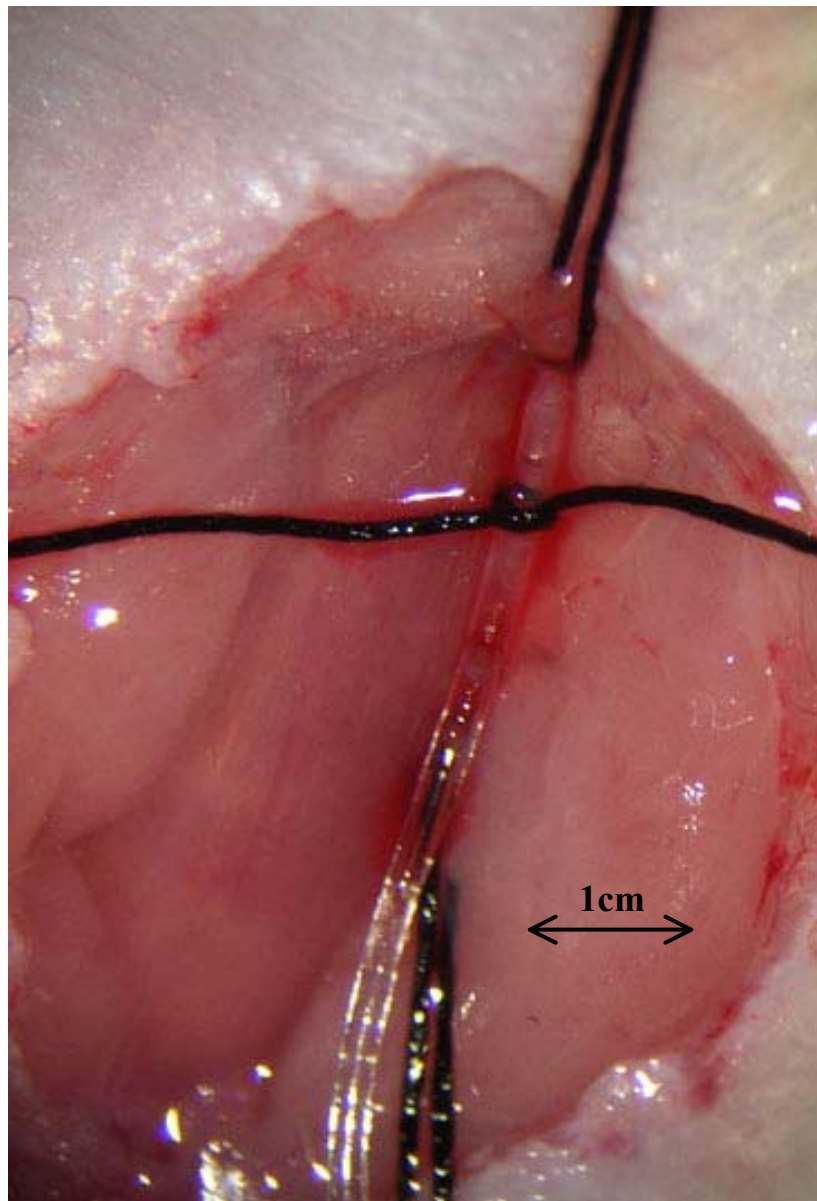


Abb. 7: Nach dem Einführen des Katheters in das Gefäß wird er mit dem mittleren Faden zunächst fixiert, um dann die Katheterspitze bis zu ihrer endgültigen Position vorzuschieben.

Ein weiterer Polyethylen-Katheter wurde in die linke V. jugularis eingebunden. Über diesen ist während des gesamten Experimentes eine Kreislauf-stabilisierende Kochsalz-Lösung (0.9%) mit einer vom Körpergewicht abhängigen Geschwindigkeit von $1.5\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{g K}$ infundiert worden. Das OP-Feld ist anschließend mit einer Mullkomresse abgedeckt und während des gesamten Experimentes feucht gehalten worden.

Im folgenden wurde zur Vermeidung größerer Blutungen mit Hilfe eines Coueters das Abdomen entlang der Linea alba im Peritoneum eröffnet. Um das Sammeln des Urins zu ermöglichen, ist ein etwa 2cm langer Polyethylen-Katheter mit verbreitertem Rand in die Harnblase eingebunden sowie die Urethra abgebunden worden. Für eine spätere Ligatur und die damit beabsichtigte Erhöhung des peripheren Widerstandes wurden Fäden mit vorbereiteten Knoten um die zuvor isolierten Aa. mesenterica und coeliaca gelegt. Da die Gefäße im Splanchnicus coeliacus eingebettet sind, wurde mit äußerster Vorsicht präpariert. Weiterhin wurde die retroperitoneal gelegene Aorta abdominalis für das spätere Setzen eines Clips freigelegt. Nach Replazierung des für die Freilegung der Gefäße seitlich fixierten Darmes und Füllung der Bauchhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung wurde auch hier das OP-Feld mit einer befeuchteten Mullkomresse bedeckt.

Nach Öffnung des Abdomens entlang der peritonealen Linea alba, dem Legen des Blasenkatheters sowie der Präparation der Aa. mesenterica und coeliaca sowie der Freilegung der Aorta inferior wurde zunächst die A. renalis von der Vene isoliert, um daraufhin um diese herum die Flowprobe (Abb. 8) – ein miniaturisierter Dopplersonograph – unter Verwendung eines Mikromanipulators zu plazieren. Die Mobilisierung der A. renalis mußte schnell erfolgen, um ischämische Reaktionen zu vermeiden. Um einen optimalen Kontakt zwischen Gefäß und Doppler-Sonograph zu gewährleisten, wurde luftblasenfrei medizinisches Gleitgel (HR Lubricating Jelly) auf die Flowprobe getropft.

Durchführung der Messung

Nach einem Äquilibrium von etwa etwa 30-40 min und Erreichen des „Steady States“ wurde die Messung gestartet. Dazu wurden zunächst unter Ausgangsbedingungen 2x10-20min Urin gesammelt und sowohl der Blutdruck als auch der renale Blutfluß gemessen. Im folgenden wurde schrittweise der periphere Widerstand erhöht. Für die erste Druckstufe wurde in Abhängigkeit von der Größe des Druckanstieges, der mindestens 15 mm Hg

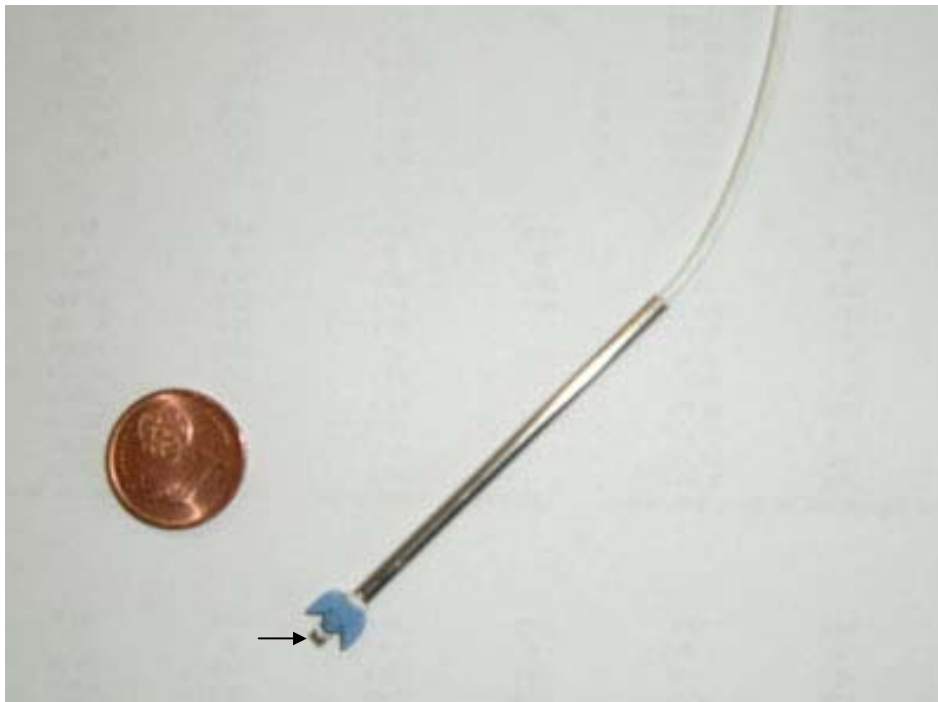


Abb. 8: Transonic-Flowprobe zur akuten Messung des renalen Blutflusses. Das Gerät funktioniert nach dem Prinzip eines Doppler-Sonographen. Die *A. renalis* wird auf den mit einem Pfeil gekennzeichneten Haken gelegt und im 45°-Winkel beschallt. Das von den Erythrozyten reflektierte Signal wird dann auf der gegenüberliegenden Seite empfangen.

betragen sollte, neben der *A. mesenterica* zusätzlich die *A. coeliaca* abgebunden. Nach einem kurzen Äquilibrium von 4-7min und erneutem Erreichen des „Steady States“ wurde wiederum 2x Urin und Plasma gesammelt sowie Blutdruck und RBF registriert. In gleicher Weise wurde auch auf der dritten Druckstufe nach Occlusion der Aorta unterhalb der Niere mit einem Clip und gegebenenfalls der Ligatur der *A. coeliaca* verfahren. Blutentnahmen erfolgten während des Experimentes nicht. Lediglich am Ende des Experimentes wurde eine Kapillare Blut (ca. 50µl) für die Bestimmung des Hämatokrits entnommen. Die Meßwerte für den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und den renalen Blutfluß (RBF) wurden über die jeweilige Meßperiode gemittelt.

Nach Beendigung des Experimentes wurden auch hier die Nieren entnommen und das Nierengewicht nach dem Entfernen der Nierenkapsel bestimmt. Die Eppendorf-Gefäße mit dem gesammelten Urin wurden gewogen und bis zur Na^+ -Ionen-Konzentrationsbestimmung bei -20°C eingefroren.

Messung der Na^+ -Ionen-Konzentration

Die Na^+ -Ionen-Konzentration wurde mit dem speziell an die mausphysiologischen Erfordernisse angepaßten Analysegerät Konelab Typ 809 auf der Basis ionenselektiver Elektroden gemessen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel gebildet.

3.4 Protokoll 3: Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Präparation und Experimentdurchführung

Die Messung der GFR erfolgte im akuten Experiment an narkotisierten Tieren durch die Bestimmung der Inulin-Clearance. Untersucht wurden männliche Wildtyp- und AT_2 -KO-Mäuse im Alter von 12-15 Wochen nach Behandlung mit L-NAME beziehungsweise DOCA-Salz sowie deren Kontrollen.

Im Hinblick auf die Präparation entspricht das Vorgehen weitgehend dem für die Messung der Druck-Diu-/Natriurese (Protokoll 2). Nach Injektionsnarkose und Kanulierung der linken A. carotis für die Druckregistrierung wurde im Unterschied zu Protokoll 2 ein Doppelinfusionssystem in die V. jugularis eingeführt und bis zum Abschluß der Präparation zunächst nur physiologische Kochsalzlösung infundiert ($1,5\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{g K}$).

Vor Beginn des Äquilibriums erhielt die Maus über das Doppelinfusionssystem zusätzlich zur bereits laufenden Kochsalz-Infusion zunächst einen Inulin-Bolus (1%) von $20\mu\text{l}/\text{min}$ und anschließend die während des gesamten weiteren Experimentes wiederum körperrgewichtabhängige konstante Infusion einprozentigen Inulins von $0,1\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{g K}$. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Inulins

wurden die Spritze sowie der Katheter mit Silberpapier beziehungsweise dunkler Beschichtung vor direkter Lichteinstrahlung geschützt.

Nach etwa 30-40 min Äquilibrium und Erreichen des „Steady States“ wurde die Messung gestartet. Dazu wurden zunächst unter Ausgangsbedingungen 2x10-20min Urin gesammelt und in der Mitte jeder Sammelperiode ca. 50µl Blut für die Hämatokritbestimmung und Plasmagewinnung über den arteriellen Katheter entnommen. Im folgenden wurde schrittweise der periphere Widerstand wie in Protokoll 2 erhöht. Aufgrund der notwendigen Blutentnahmen konnten nur in wenigen Fällen an einem Tier alle drei Druckstufen gemessen werden. Daher sind die verschiedenen Druckniveaus abwechselnd an unterschiedlichen Tieren gemessen worden – beispielsweise 1. und 2. bzw. 1. und 3. Druckstufe.

Nach Beendigung der Messung und Tötung des Tieres (Überdosis Narkotikum) wurden jedem Tier die Nieren entnommen und nach Entfernung der Nierenkapsel gewogen.

Photometrische Bestimmung der Inulinkonzentrationen

Die Messung der Konzentration des mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Inulins in den Urin- und Plasmaproben erfolgte mit dem Spezialphotometer Spectra Fluor. Dazu wurden jeweils 3 µl Probenmaterial für eine Dreifachbestimmung des Urins aufbereitet. Die Analyse des Plasmas erfolgte aufgrund der geringen Probenmenge als Doppelbestimmung. Für beide Probenarten ist wegen der stark abweichenden Konzentrationen eine gesonderte Standardkurve angesetzt worden. Vom verbliebenen Probenmaterial wurde die Na⁺-Ionen-Konzentration bestimmt. Während für die Urinproben eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, stand beim Plasma oftmals nur für eine Einfachbestimmung ausreichend Probenmaterial zur Verfügung.

3.5 Protokoll 4: Linksventrikuläre Druck- und Volumen-Messungen

Die simultane Aufnahme des linksventrikulären Druck- und Volumensignales erfolgte mit dem ARIA™-System. Das System besteht aus einem Druck-Volumen-Katheter, der mit einem Druck-Konduktivitätswandler verbunden war. Während das Blutdrucksignal mit Hilfe eines Druckwandlers mechanisch gemessen und nachfolgend in elektrische Impulse transformiert wird, erfolgt die Volumenbestimmung elektromagnetisch durch die Messung der Leitfähigkeit (Konduktivität) des umgebenden Kompartimentes.

Der Maus wurden zunächst 100µg/g K Thiopental i.p. injiziert. Nach einigen Minuten wurde ein Bolus von 0,25µg Ketavet in 50µl Kochsalzlösung i.m. verabreicht. Anschließend ist die Maus wie in Protokoll 2 auf einem Heiztisch fixiert worden, um die Körpertemperatur während des Experimentes konstant zu halten. Die Maus wurde dann tracheotomiert und künstlich mit dem Beatmungsgerät MiniVent Typ 845 bei einem Zugvolumen von 200µl und einer Geschwindigkeit von 160 Atemzügen pro Minute ventiliert. Daraufhin wurde die linke V. jugularis kanuliert und ein PE-Katheter eingebunden. Dieser war mit einer mit zehnprozentiger Kochsalzlösung gefüllten Mikroliterspritze verbunden.

Zunächst wurde in die rechte A. carotis der Druck-Volumen-Katheter eingeführt und vorsichtig unter Kontrolle des zeitgleich registrierten Druck-Volumen-Signales durch den Truncus brachiocephalicus und die ascendierende Aorta bis zum linken Ventrikel vorgeschoben. Nach Stabilisierung des Druck-Volumen-Signales durch die Korrektur der Katheterlage wurde das Setup fixiert. Da bei einer elektromagnetischen Volumenbestimmung stets neben dem eigentlichen Ventrikelvolumen immer auch das Flüssigkeitsvolumen des Myocards mit erfaßt wird, muß letzteres bestimmt und von den Meßwerten abgezogen werden, um verlässliche Parameter zu erhalten. Deshalb wurde im Anschluß an ein etwa 15 minütiges Äquilibrium, in dem die kontinuierliche Druck- und Volumenmessung das Erreichen des „Steady States“ erkennen ließ, ein Kochsalzbolus (10%) von etwa 2-3µl für die Messung des Parallelvolumens (Vp) über den Katheter in der V. jugularis gegeben. Das Parallelvolumen entspricht dem gesamten Flüssigkeitsvolumen des Myocards. Prinzip der Bestimmung des Parallelvolumens ist die unterschiedlich schnelle Osmolaritätsänderung bei herznaher Infusion hyperosmolarer Kochsalzlösung in den Ventrikeln und im Myocard selbst. Auf diese Weise kann das Volumen beider Kompartimente bestimmt werden. Bei der Bolusgabe sollte sich ausschließlich das Volumensignal bei konstantem Drucksignal

verändern. Ferner wurde zur Vermeidung der respiratorischen Sinus-Arrhythmie die Beatmung kurzzeitig unterbrochen.

Anschließend wurde das Abdomen eröffnet und die V. cava inferior freipräpariert. Nach einer weiteren Äquilibrationsphase und dem Erreichen des „Steady States“ wurde die Hohlvene bei unterbrochener Beatmung mit einer Pinzette kurz occludiert. Anhand der sich durch die Abnahme der Vorlast simultan verändernden Druck- und Volumensignale können weitere, Last-unabhängige Parameter berechnet werden. Unmittelbar im Anschluß an die Occlusion wurde ein weiterer venöser Kochsalzbolus gegeben, um durch die erneute Bestimmung des V_p mögliche, durch die Laparotomie hervorgerufene Veränderungen der Ausgangsbedingungen für die Messung erkennen zu können.

3.6 Protokoll 5: Bestimmung des Totalen Peripheren Widerstandes an der nicht-narkotisierten Maus durch die Simultanmessung des Herzminutenvolumens und des Mittleren Blutdruckes

Für die Bestimmung des Totalen Peripheren Widerstandes (TPR) ist die simultane Erfassung des Herzminutenvolumens (Cardiac Output = CO) und des Mittleren Arteriellen Blutdruckes (MAP) nötig. Der TPR ergibt sich aus folgendem Zusammenhang: $TPR = MAP/CO$. In zwei aufeinanderfolgenden Sitzungen wurden den Tieren eine perivaskuläre Transit-time-Flowprobe um die Aorta ascendens und ein Sender für die telemetrische Messung des Blutdruckes implantiert (siehe Abb. 9). Die technischen Protokolle sind im folgenden angeführt. Für diese Messserie wurden ausschließlich Kontrolltiere (AT_{2+}/y) verwendet.

3.6.1 Implantation einer perivaskulären Flowprobe um die ascendierende Aorta zur chronischen Messung des Herzminutenvolumens

Die in diese Meßgruppe eingegangenen Tiere wurden aufgrund der Schwere des operativen Eingriffes in erster Linie nach einem Mindestkörpergewicht von 28 g ausgewählt. Daraus ergibt sich eine größere Variabilität des Lebensalters der Tiere zum Versuchsbeginn.

Die Maus wurde zunächst durch Kurzzeitnarkose aus 113µg/g K Ketavet und 8µg/g K Xylazin sediert und anschließend das Operationsfeld ventral und lateral rasiert und enthaart. Anschließend ist das Tier dorsal auf dem Heiztisch fixiert und nachfolgend mit einem an die Atempumpe MiniVent angeschlossenen, spitz ausgezogenen PE50-Katheter intubiert worden. Die Atemfrequenz betrug 160 Züge pro Minute und das Atemzugvolumen 200µl.

Ausgehend vom Sternum erfolgte der Hautschnitt auf der rechten Seite in Höhe der Vorderextremität. Der darunter liegende M. pectoris wurde vorsichtig stumpf von den Rippen gelöst und mit einem Faden auf die linke Seite gezogen. Mit einer spitzen Pinzette wurde der Thorax dann im dritten Intercostalraum eröffnet. Die Rippen sind vorsichtig mit einem Retraktor gespreizt worden. Um die Aorta besser darstellen zu können, wurde die Maus links-lateral gelagert.

Daraufhin wurde der Thymus aus dem Operationsfeld geschoben und die darunter verlaufende Aorta freipräpariert. Ein um die Aorta gelegter Halte-Faden sollte die Mobilisierung des Gefäßes erleichtern. Die desinfizierte nach dem Prinzip eines Doppler-Sonographen funktionierende Transit-time-Flowprobe wurde in den Thorax eingeführt und die Aorta mit Hilfe des um das Gefäß gelegten Fadens zügig auf dem Haken des Meßkopfes plaziert.

Nach Überprüfung der Qualität des Signales wurde der Retraktor und der um die Aorta gelegte Faden entfernt und der Intercostalraum durch eine Naht verschlossen, durch die gleichzeitig das Kabel der Flowprobe fixiert worden ist. Nach Repositionierung des M. pectoris und Wundversorgung mit Polyspectran-Salbe wurde mit einer fortlaufenden Naht begonnen, die Haut zu vernähen. Schließlich mußte der Stecker für das Anschlußkabel des Flußmeßgerätes unter Fortsetzung des lateralen Hautschnittes und Fixierung des Kabels der Flowprobe im Nacken des Tieres eingenäht werden. Der Anschlußstecker wurde dazu in einen Plastikring geschoben, der anschließend an der Nackenmuskulatur mit einem Knoten fixiert und dann sorgfältig mit einer Tabaksacknaht subcutan eingenäht worden ist. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da dadurch einerseits die Stabilität der Flowprobe im Thorax erhöht wird, andererseits aber auch das Kabel für das Tier unerreichbar ist und nicht durchgebissen werden kann.

Zur Ausleitung der Narkose wurde abschließend ein Atipamezol-Bolus (Antidot) 0,025mg i.m. verabreicht. Nach Erwachen des Tieres und Einsetzen der Spontanatmung, wurde die Maus extubiert und behutsam in ein vorgewärmtes Käfigglas gesetzt. Hier verblieb die Maus die ersten 24 Stunden nach der Operation.

Nach Stabilisierung des postoperativ oftmals stark abfallenden Körpergewichtes (ca. 14 Tage) ist der nun bereits mit einer Flowprobe instrumentierten Maus in einer zweiten Sitzung ein Telemetriesender für die kontinuierliche Blutdruckmessung implantiert worden. Als Zugangsgefäß für den Messkatheter wurde bei allen Tieren die rechte Arteria carotis communis präpariert (s. Protokoll 1).

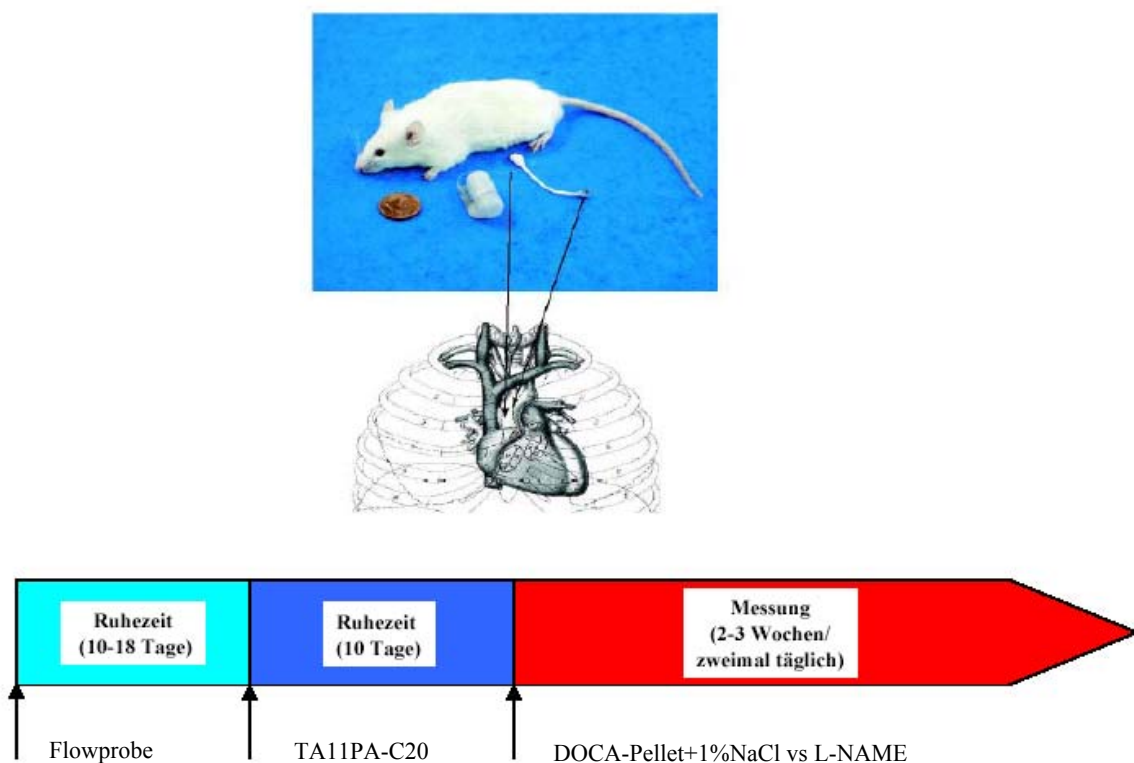


Abb. 9: Darstellung der Implantationsorte der Flowprobe und des Telemetriesenders in tatsächlichem Verhältnis zur Körpergröße der Maus. Abgebildet ist außerdem das Operations- und Versuchsschema.

3.6.2 Simultanerfassung des Herzminutenvolumens und des Blutdruckes

Mit dem Beginn der Datenerfassung wurde nach den operativen Eingriffen bis zur erneuten Stabilisierung des Körpergewichtes sowie der Einstellung der circadianen Rhythmik von Herzrate und Blutdruck gewartet. Auch bei den in dieser Serie durch den zweifachen operativen Eingriff stark belasteten Tieren betrug die Rekonvaleszenzzeit im Durchschnitt nicht mehr als 5-7 Tage.

Die Datenerfassung erfolgte zweimal täglich. Nach dem Anschließen der Maus an das Flußmeßgerät, wurde zunächst eine Äquilibratorperiode von ca. 5 Minuten bis zur Stabilisierung des Flußsignales abgewartet, um dann mit der eigentlichen Datenaquise zu beginnen. Es wurden für jede Messung jeweils 10 Minuten lang Blutdruck- und Herzminutenvolumen-Werte kontinuierlich registriert.

3.7 Protokoll 6: Uninephrektomie

Die Tiere wurden mit Kurzzeitanarkose oder Isofluran sediert und links-lateral gelagert. Nach einem unmittelbar caudal von der letzten Rippe beginnenden, sagittal verlaufenden Hautschnitt wurde vorsichtig die Bauchhöhle eröffnet. Mit zwei Wattestäbchen ist die Niere dann vorsichtig herausgezogen und in einen Lidhalter aus der Ophtalmologie eingespannt worden. Die im Nierenstamm verlaufenden Gefäße wurden mit einem Faden abgebunden und die Niere vom Nierenstamm abgeschnitten. Die Gabe von etwas Polyspectran-Salbe in die Bauchhöhle sollte einer Entzündung der Wunde vorbeugen. Die Wunde wurde anschließend schichtweise vernäht.

3.8 Untersuchungen in Stoffwechselkäfigen

Die Untersuchung der Diu- und Natriurese an nichtnarkotisierten Tieren wurde mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen (Metabolische Käfige) vorgenommen. Diese sind so konstruiert, daß der gesamte Urin des Tieres über einen Trichter abläuft und in einem Sammelgefäß aufgefangen wird (Abb. 10). Die Mäuse werden einzeln gehalten und verbleiben maximal drei Tage im Stoffwechselkäfig. Da sich das Tier zunächst an die neue Umgebung gewöhnen muß, werden die Proben des ersten Tages verworfen.

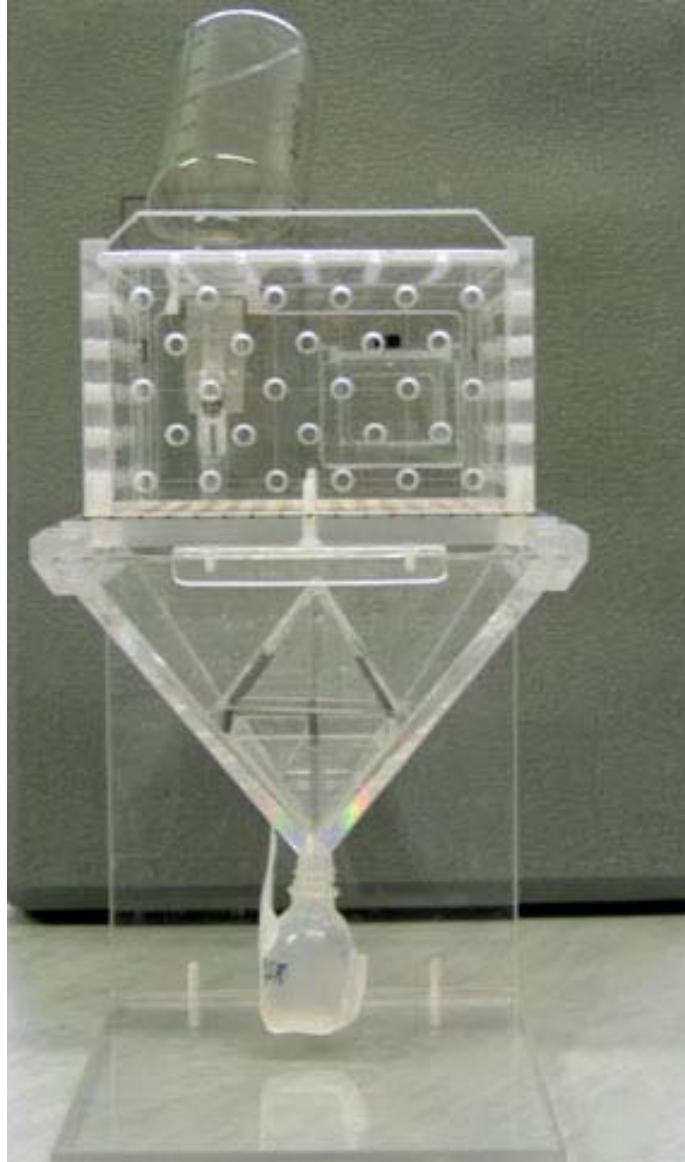


Abb. 10: Metabolischer Käfig für die chronische Messung der Trinkwasseraufnahme und Urinausscheidung.

3.9 Induktion der L-NAME-Hypertonie

N^o Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) – ein nonselektiver Blocker der Stickstoffmonoxid-Synthese – wird den Tieren mit dem Trinkwasser verabreicht (5mg/10 ml Wasser). Bei dieser Konzentration nehmen die Tiere durchschnittlich 0,13 mg/g Körpergewicht pro Tag auf. Die tägliche Trinkmenge wurde regelmäßig kontrolliert und unterschied sich nicht zwischen den Stämmen, wodurch eine einheitliche L-NAME-Aufnahme gewährleistet war. Die Trinklösung wurde zweimal wöchentlich erneuert. Diese chronische Vorbehandlung dauerte je nach Versuchsansatz eine bzw. drei Wochen (s. Abb 5).

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der L-NAME-Hypertonie vom AT₁-Rezeptor ist einigen telemetrisch überwachten Tieren in der dritten Woche der L-NAME-Gabe zusätzlich 50mg/kg pro Tag Valsartan *per gavage* (=Schlündeln) verabreicht worden. Abb. 5 ist zu entnehmen, in welchem Versuchszusammenhang diese Behandlung vorgenommen wurde.

3.10 Induktion der DOCA-Salz-Hypertonie

Desoxycorticosteronacetat (DOCA) – ein Mineralkortikoid, das als Vorstufe in der Biosynthese von Aldosteron entsteht – ist in Form von Tabletten mit unterschiedlicher Wirkstoffmenge erhältlich. Diese Pellets werden subcutan implantiert. Dazu wird die DOCA-Tablette unter Isofluran-Narkose nach einem kleinen Hautschnitt im Nacken und anschließender Ausformung einer subcutanen Tasche möglichst weit caudal vorgeschoben und die Wunde anschließend vernäht. Wird das Pellet nicht weit genug vorgeschoben, platzen die Wundränder auf und das Pellet tritt hervor, womit die gleichmäßige Abgabe des Wirkstoffes gestört ist.

Die Mäuse bekamen 50 mg DOCA-Pellets, die den Wirkstoff innerhalb von drei Wochen abgaben. Zur Verstärkung der blutdrucksteigernde Wirkung von DOCA wurde – wie bei diesem Modell allgemein üblich – dem Trinkwasser einprozentig Kochsalz hinzugefügt. In einigen Experimentserien wurde den Tieren zur Verstärkung des hypertensiven Effektes außerdem die rechte Niere entfernt. Die Verwendung uninephrektomierter Tiere ist dem Versuchsschema in Abb. 5 zu entnehmen. Außerdem wurde einem Teil der Tiere aus der

Telemetrieserie 10mg/kg pro Tag (N-[2-(2-Guanidinoethyl)disulfanyl]ethyl)-guanidin(hydrogencarbonat) (GED), ein iNOS-Hemmer, intraperitoneal injiziert, um die Blutdruckrelevanz der iNO-Synthase zu überprüfen. Welche Tiere verwendet wurden, ist aus dem Versuchsschema (Abb. 5) ersichtlich.

3.11 Statistische Datenanalyse

Alle der in dieser Arbeit für die verschiedenen Meßparameter angegebenen Werte stellen einheitlich das Arithmetische Mittel sowie dessen Standardfehler (SEM) dar. Je nach Experiment-Design wurden zwei unterschiedliche statistische Verfahren angewandt. In der Telemetrie und bei der Messung des Herzminutenvolumen wurden am selben Tier sowohl Meßwerte unter Ausgangsbedingungen als auch nach Gabe von L-NAME bzw. DOCA-Salz erfaßt. Für die statistische Analyse wurde hier der gepaarte Student's t-Test verwendet.

Für einen Teil der Versuche (akute Experimente wie Herzkatheter, GFR-Messung und Bestimmung des RBF) ergaben sich 2 Gruppen für die beiden zu untersuchenden Mausstämme (AT₂-KO und Wildtyp) sowie zwei Gruppen nach Induktion eines der in dieser Arbeit untersuchten sekundären Hypertoniemodelle (L-NAME und DOCA-Salz). Somit ergeben sich für jede experimentelle Serie 4 Untersuchungsgruppen, d.h. zwei unterschiedliche Populationen und ein Behandlungsfaktor. Die statistische Prüfung erfolgte daher mit Hilfe der Two-way-Anova-Analyse. Als Post-hoc-Verfahren wurde der Duncan Test gewählt.

3.12 Verwendete Geräte und Pharmaka

Im folgenden sind die in den Experimenten verwendeten Geräte und Pharmaka unter Angabe des Produktnamens und der Herstellerfirma angeführt.

Geräte

- ARIA™-System: SPR 1.4 French Druck-Volumen-Katheter+ MPCU-200 Druck-Konduktivität-Wandler, Millar Instruments Houston, Texas, USA
- Konelab Typ 809, Konelab Corporation, Espoo, Finnland
- MiniVent Type 845 (Beatmungsgerät), Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- RFBTA11PA-C20 (Telemetriesender), Data Science International, St. Paul/MN, USA
- Spectra Fluor, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
- Stoffwechselkäfig, UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Holland
- Transit-time Flowprobe (Akutmessung RBF), Transonic Systems Inc, Ithaca, USA
- Transit-time Flowprobe (chronische Messung HMV) 1.5SL, Transonic Systems Inc, Ithaca, USA

Pharmaka

- Atipamezolhydrochlorid, Orion-Pharma, Espoo, Finnland
- Desoxycorticosteronacetat (DOCA), Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA

- Heparin-Natrium Braun “Multi”, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- HR Lubricating Jelly (Kontaktgel für die Flowprobe), Mohawk Medical Supply, Utica/NY, USA
- Inactin/Thiobutabarbital sodium salt T-133, 1g, Research Biochemicals International, Natick, Massachusetts, USA
- Inulin (Fluorescein-Isothiocyanate-Inulin), Sigma, St. Louis, MO, USA
- Isofluran, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ketavet 100mg/ml, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Deutschland
- N-[2-(2-Guanidinoethyl)disulfanyl]ethylguanidin(hydrogencarbonat) (GED), Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA, USA
- N^o Nitro-L-Argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME), Sigma, St. Louis, MO, USA
- Polyspectran-Salbe, Alcon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland
- Thiopental-Natrium, Nycomed Pharma GmbH, Ismaning, Deutschland
- Valsartan, Novartis International AG, Basel, Schweiz
- Xylazin, mv-Pharma, Bad-Oldesloe, Deutschland