

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Um die Rolle des RAAS und des katecholaminergen Systems auf die Prävention einer diabetischen Vaskulopathie bei Diabetes Mellitus Typ 1 zu untersuchen, wurden diese Systeme durch eine pharmakologische Intervention mit dem selektiven AT1-Antagonisten Candesartan und mit dem selektiven β 1-Blocker Metoprolol inhibiert. Es wurden normoglykämische Sprague Dawley Ratten (SD) mit diabetischen Sprague Dawley Ratten (STZ) verglichen. Hierdurch konnte die Entwicklung einer diabetischen Vaskulopathie evaluiert werden. Normoglykämische und diabetische Tiere wurden medikamentös mit Candesartan und Metoprolol behandelt. Die jeweilige Dosis wurde so gewählt, dass sie den Blutdruck und die Herzfrequenz nicht wesentlich veränderte. In einer Vorstudie wurde zuvor eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Medikamente ermittelt, um eine Dosis zu finden, die den Blutdruck und die Herzfrequenz von Kontrollratten nur minimal beeinflusst. In der Hauptstudie wurde *in vivo* die Gefäßfunktion von Widerstandsgefäßen nach einer chronischen Behandlung mit Candesartan oder Metoprolol über 41 Tage von diabetischen und normoglykämischen Ratten gemessen. Der gesamte Beobachtungszeitraum betrug 48 Tage.

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 im Rahmen der Vorstudie zur Dosisfindung der zu untersuchenden Medikamente verwendet:

1. SD (normoglykämische Ratten als Kontrollen)
2. SDMeto30 (normoglykämische Ratten, behandelt mit 30 mg/kg/24h Metoprolol p.o.)
3. SDMeto50 (normoglykämische Ratten, behandelt mit 50 mg/kg/24h Metoprolol p.o.)
4. SDCan (normoglykämische Ratten, behandelt mit 1,5 mg/kg/24h Candesartan p.o.)

Die Anzahl der Tiere betrug in allen Gruppen $n=8$. Alle pharmakologisch behandelten Tiere erhielten das jeweilige Medikament analog zur Hauptstudie über einen Zeitraum von 41 Tagen. Danach wurden die Tiere einer invasiven arteriellen Blutdruckmessung zugeführt.

Im Rahmen der Hauptstudie zur Evaluierung der Gefäßfunktion wurden folgende Tiergruppen verwendet:

1. SD (normoglykämische Ratten als Kontrollen)
2. SDMeto30 (normoglykämische Ratten, behandelt mit 30 mg/kg/24h Metoprolol p.o.)
3. SDCan (normoglykämische Ratten, behandelt mit 1,5 mg/kg/24h Candesartan p.o.)
4. STZ (diabetische Ratten)
5. STZMeto30 (diabetische Ratten, behandelt mit 30 mg/kg/24h Metoprolol p.o.)
6. STZMeto50 (diabetische Ratten, behandelt mit 50 mg/kg/24h Metoprolol p.o.)
7. STZCan (diabetische Ratten, behandelt mit 1,5 mg/kg/24h Candesartan p.o.)

Die Anzahl der Tiere betrug in allen Gruppen $n=8$. Alle pharmakologisch behandelten Tiere erhielten das jeweilige Medikament 7 Tage nach STZ Injektion über einen Zeitraum von 41 Tagen. Der Beobachtungszeitraum der Studie betrug 48 Tage ab STZ Injektion. Am 48. Tag wurden die Tiere der invasiven Gefäßcharakterisierung 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 (Sigma Aldrich, Deutschland) verwendet. STZ konnte in den sechziger Jahren aus dem Bakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert werden [87] und wurde als Breitspektrum-Antibiotikum eingesetzt. STZ besitzt darüber hinaus noch karzinogene Eigenschaften [88]. 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 [89].

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 [90]. 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.

2.4.3 Auswahl des Modells

Zur Untersuchung des Diabetes Mellitus Typ 1 und dessen vaskuläre Komplikationen gibt es eine Reihe von diabetischen Tiermodellen. Das STZ-Modell war und ist eines der bedeutendsten Tiermodelle, um einen dem Menschen möglichst ähnlichen Diabetes Mellitus Typ 1 und deren Komplikationen zu untersuchen. Andere Diabetesmodelle haben gegenüber dem STZ-Modell erhebliche Nachteile.

Bei der chirurgischen Entfernung des Pankreas zur Induktion eines Diabetes Mellitus Typ 1 würden neben den β -Zellen auch alle weiteren für den Stoffwechsel bedeutenden Pankreaszellen mit entfernt, die bei nicht-toxischer STZ-Dosierung in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden. Für das STZ-Rattenmodell ist bekannt, dass erst Dosen größer 100 mg/kg KG STZ zytotoxisch auf den Organismus wirken [91, 92]. Diese Dosierung wurde in dieser Studie mit 70 mg/kg KG STZ deutlich unterschritten. STZ

verursacht in der hier verwendeten Dosis einen schweren Diabetes, der nach sechs Wochen zu einer Verminderung des Körpergewichtes gegenüber den gleichaltrigen normoglykämischen Kontrollen führt. Aus anderen Untersuchungen ist auch bekannt, dass STZ-diabetische Tiere nach einem sechs Wochen dauernden Diabetes einen signifikanten Gewichtsverlust aufweisen [93]. Die STZ-diabetische Ratte weist viele weitere Symptome auf, die beim Menschen mit Diabetes Mellitus Typ 1 auftreten. Dazu gehören neben einer ausgeprägten Hyperglykämie auch Polydipsie, Glykosurie und Polyurie. Diese Veränderungen konnten auch in dieser Studie beobachtet werden. STZ-diabetische Ratten benötigen kein exogenes Insulin, da bei der hier verwendeten Dosis STZ eine residuale Insulinsekretion noch funktionierender β -Zellen verbleibt. Weitere Vorteile dieses Modells sind der hohe Grad an Reproduzierbarkeit und ein im Vergleich zum Menschen kurzer Beobachtungszeitraum. Auch aus ökonomischer Sicht ist dieses Modell gut einzusetzen. Das STZ-Tiermodell ist insbesondere zum Studium des Diabetes Mellitus Typ 1 und der Konsequenzen eines metabolischen Kontrollverlustes über den Glukosestoffwechsel relevant [94], insbesondere, weil dieses Rattenmodell keine schwere Hyperlipidämie aufweist. Daher ist dieses Modell gut geeignet um im Tiermodell die Eigenschaften der Typ-1-diabetischen Vaskulopathie bei Diabetes Mellitus Typ 1 zu imitieren. Dies wurde erstmals 1998 durch *in vivo* Untersuchungen am STZ-diabetischen Rattenmodell gezeigt [95]. Hierbei konnte eine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion gemessen werden. Diese Veränderungen manifestieren sich auch am Typ 1-diabetischen Patienten [96, 97]. Dieselben vaskulären Veränderungen, die sich beim Menschen mit Diabetes Mellitus erst nach Monaten bis Jahren nachweisen lassen, treten im STZ-Rattenmodell somit bereits nach sechs Wochen auf. Neben den experimentellen Möglichkeiten, die diabetische Vaskulopathie *in vivo* zu erforschen, ist das STZ-Modell daher auch zur Entwicklung neuer Therapiestrategien in einem überschaubaren Zeitrahmen sehr gut einsetzbar. Zusammenfassend erwies sich das eingesetzte Tiermodell als geeignet zur Erforschung des Einflusses einer Therapie mit Candesartan oder Metoprolol bei der diabetischen Vaskulopathie im Sinne der Fragestellung.

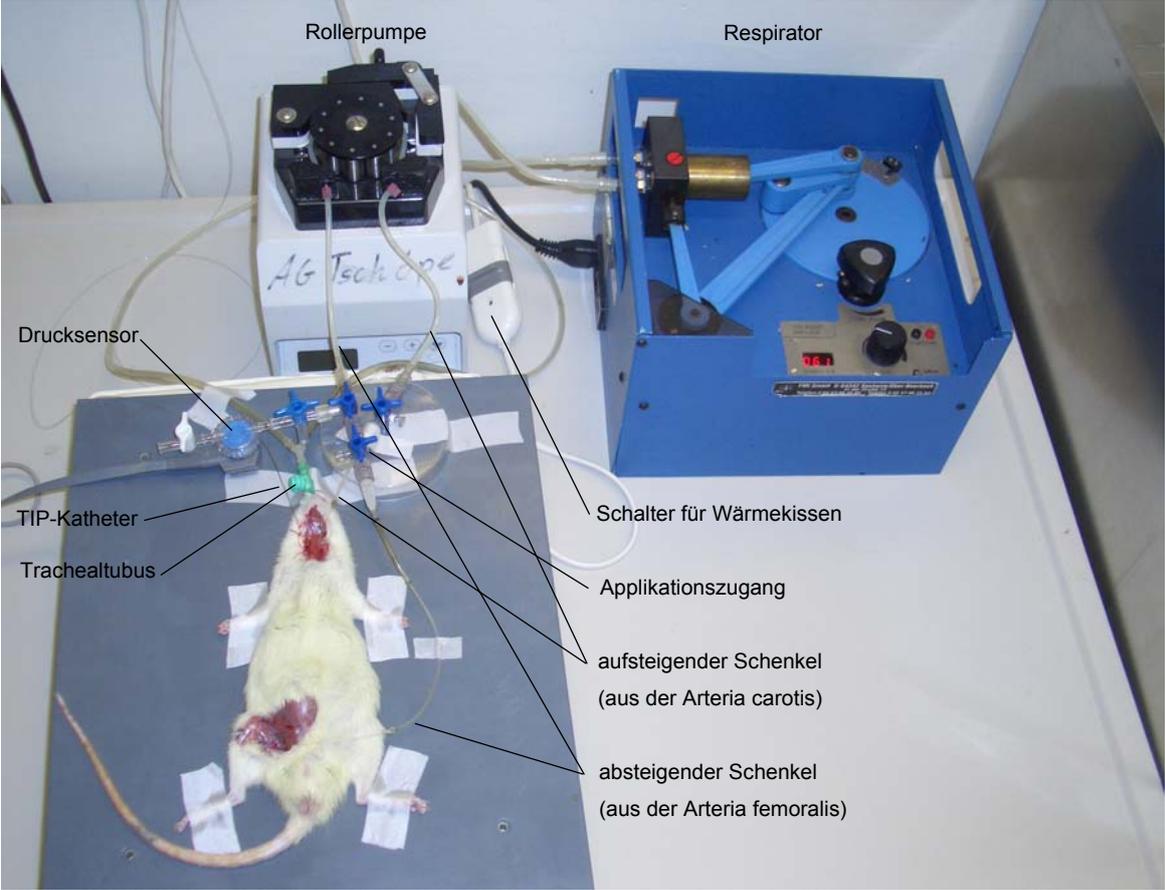
2.5 Erfassung der Gefäßfunktion

Die Bestimmung der Gefäßfunktion erfolgte mittels des Modells des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte. Mit diesem Modell ist es möglich, *in vivo* die Gefäßfunktion von Widerstandsgefäßen im Endstromgebiet der Arteria femoralis zu beschreiben [95]. Dadurch kann im Gegensatz zu *in vitro* Messungen auch der Einfluss des Gesamtorganismus, insbesondere des neurohumoralen Systems auf das Zielorgan berücksichtigt werden. Dieses Modell wurde eigens für diese Studie in unserem Labor etabliert und entsprechend der spezifischen Fragestellung modifiziert.

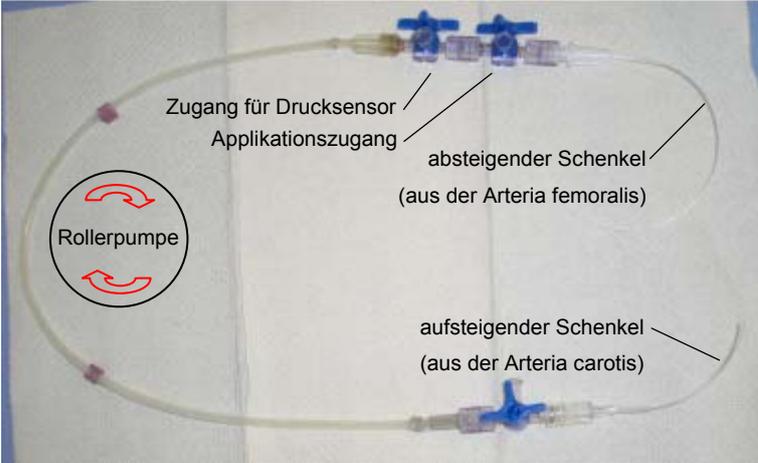
2.5.1 Methodik des autoperfundierten Hinterbeines

Bei dem Modell des autoperfundierten Hinterbeins wird ein extrakorporaler Kreislauf zwischen der Arteria carotis sinistra und der Arteria femoralis dextra angelegt (siehe Figur 1 und 2). Dadurch werden die systemischen Druckschwankungen während der Systole beziehungsweise der Diastole ausgeschaltet. Der extrakorporale Kreislauf ist nötig, um einen laminaren und konstanten Blutfluss im Hinterbein sicherzustellen und um die Möglichkeit der Druckmessung und Substanzapplikation zu gewährleisten. Er besteht, wie weiter unten näher erläutert, aus Kunststoffkathetern. Integrierte handelsübliche 3-Wege-Hähne ermöglichen das Ableiten des Druckes und die Applikation in das Hinterbein. Eine Rollerpumpe (ABIMED, Deutschland) stellt einen konstanten, laminaren Fluss (2ml/kg/min) aus der Arteria carotis in die Arteria Femoralis sicher und trennt den extrakorporalen Kreislauf in einen aufsteigenden (von der A. carotis bis zur Rollerpumpe) und einen absteigenden (von der Rollerpumpe bis zur A. femoralis) Schenkel. Durch diese Autoperfusion baut sich ein weitgehend konstanter Druck im absteigenden Schenkel des Kathetersystems auf. Mittels eines Abganges in diesem Teil des Kathetersystems kann dieser Druck mit einem Sensor (ABIMED, Deutschland) gemessen werden. Dieser resultiert aus dem Gesamtwiderstand der A. femoralis und ihrem Endstromgebiet. Bei einer Dilatation der Gefäße in diesem Bereich kommt es bei einem konstanten Fluss zu einer Verringerung des Gesamtwiderstandes. Es resultiert ein Druckabfall im absteigenden Schenkel des Kathetersystems. Eine Erniedrigung des Druckes ist unter diesen Bedingungen nur möglich, wenn sich der Durchmesser der A. femoralis und/oder der Arterien in ihrem Gefäßbett vergrößert.

Figur 1: Modell des autoperfundierten Hinterbeines



Figur 2: Kathetersystem im Modell des autoperfundierten Hinterbeines



2.5.2 Operativer Eingriff

2.5.2.1 Invasive Blutdruckmessung im Rahmen der Vorstudie

Um eine Dosis-Wirkungsbeziehung bezüglich der Hämodynamik zu finden, wurden alle Tiere narkotisiert, intubiert und beatmet (siehe Hauptstudie). Die hämodynamischen Daten wurden während einer kurzen Apnoe aufgenommen, um eine Beeinflussung durch die Beatmung auszuschließen. Die Operationstechnik und die Materialien entsprechen der Hauptstudie und sind im Abschnitt 3.5.2.5 näher beschrieben.

2.5.2.2 Hauptstudie

2.5.2.3 Narkose

Als Narkotikum wurde Chloralhydrat in einer Dosis von 400 mg/kg eingesetzt. Es wurde durch eine intraperitoneale Injektion verabreicht.

2.5.2.4 Intubation und Ventilation

Zur Intubation wurden die Ratten in Rückenlage fixiert. Nach Anheben der Zunge wurde unter Sicht ein Tubus in die Trachea vorgeschoben. Als Kriterium für eine erfolgreiche Intubation diente die visuelle Feststellung einer gleichmäßigen und respiratorabhängigen Thoraxbewegung. Die Ventilation erfolgte mit Raumluft und einem Hubvolumen von 6,5 ml/kg bei einer Beatmungsfrequenz von 60/min.

2.5.2.5 Anlegen des extrakorporalen Kreislaufes

Es wurde ein medianer Hautschnitt von caudal nach kranial mit einer Länge von ca. 2 cm von der Fossa jugularis des Manubrium Sterni bis kurz vor den Mandibulabogen des überstreckten Kopfes durchgeführt. Die epifasziale Speicheldrüse wurde getrennt und der M. sternocleidomastoideus wurde beidseits dargestellt. Durch einen medialen submuskulären Zugang wurden die A. Carotis beidseits dargestellt und distale wie proximale Blutsperrern angelegt. In die rechte Carotis wurde dann ein 2,0 french TIP-Katheter eingeführt und nach Lösen der distalen Blutsperrre zur Kreislaufkontrolle vor die Aortenklappe geschoben. In die linke Carotis wurde in gleicher Technik ein 0,8 mm Polyethylenkatheter eingeführt, der das Ende im aufsteigenden Teil des extrakorporalen Kreislaufes darstellt. Zur Anlage des distalen Teiles des extrakorporalen Kreislaufes an die rechte A. femoralis wurde zunächst ein horizontaler Hautschnitt von der Mitte des

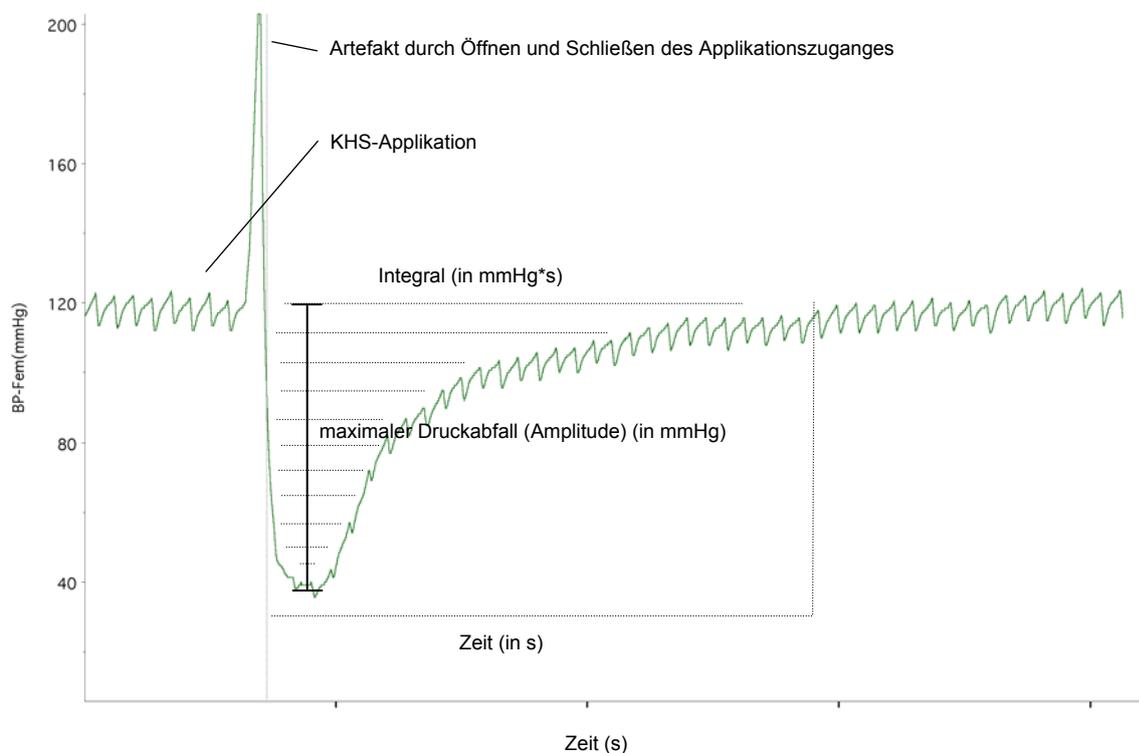
Rumpfes bis zum rechten Knie durchgeführt. Nach Präparation des subkutanen Fettgewebes konnte die A. femoralis dargestellt werden. Auch an diesem Gefäß wurden eine proximale und eine distale Blutsperre angelegt. Nun wurde das Ende des absteigenden Schenkels des Katheterkreislaufes (0,61 mm Endstück) in die A. femoralis eingeführt. Nach dem Lösen der Blutsperre wurde die Rollerpumpe in Betrieb genommen, so dass das Blut mit einem konstanten Fluss von 2,2 ml/kg/min aus der linken A. Carotis in die rechte A. femoralis befördert wurde. Nach ca. 20 Minuten war die abgeleitete Druckkurve stabil und die Messung konnte begonnen werden.

2.5.3 Gefäßfunktion

2.5.3.1 Messung der Gefäßfunktion

Nach Erreichen einer stabilen Druckkurve wurden über einen 3-Wege-Hahn im absteigenden Schenkel des extrakorporalen Kreislaufs bei jedem Tier drei endothelabhängige und eine endothelunabhängige Vasodilatationen induziert. Es wurde die Fläche, also das Integral (I in mmHg*s) und die maximale Amplitude des Druckabfalls während einer Gefäßdilatation gemessen. So kann sowohl das Maximum und die Dauer der Dilatation berücksichtigt werden.

Figur 3: Druckveränderung während einer Vasodilatation



2.5.3.2 Endothelabhängige Gefäßdilatation

Eine endothelabhängige Gefäßdilatation wurde durch eine temporäre Erhöhung der Schubspannung (S) induziert. Dazu wurden drei konstante Volumina Krebs-Henseleit-Lösung (KHS) (80, 200, 600 $\mu\text{l}/\text{kg}$) über den absteigenden Schenkel des Katheterkreislaufs in die A. femoralis appliziert. Die resultierende Vasodilatation konnte in einer Pilotstudie durch eine vorherige Gabe des NO-Synthase-Inhibitors N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) (Sigma Aldrich, Deutschland) zu 90 % unterbunden werden. L-NAME ist ein Argininanalogon und inhibiert die NO-Synthase in Endothelien [98].

2.5.3.3 Endothelunabhängige Gefäßdilatation

Eine endothelunabhängige Dilatation wurde durch die Gabe des NO-Donators Nitroprussid Natrium (NN) (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) über den gleichen Applikationsweg wie bei der endothelabhängigen Gefäßdilatation induziert.

2.5.4 Auswahl des Modells zur Erfassung der Gefäßfunktion

Untersucht wurde zunächst die endothelvermittelte Vasodilatation. Als Stimulus für eine endothelabhängige Dilatation wurde die Schubspannung („*Shear Stress*“) gewählt, da dieser beim Menschen unter physiologischen Bedingungen der wesentliche Stimulus für die Regulation des Gefäßtonus ist, insbesondere im Vergleich zu rezeptorvermittelten Stimuli, wie beispielsweise Acetylcholin. Aus diesem Grund wurde das Modell des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte entsprechend modifiziert. Der Shear Stress Stimulus wurde durch eine Volumenapplikation von KHS-Puffer induziert. Dieser Puffer wurde gewählt, da er seit Jahrzehnten im Bereich der Perfusionsphysiologie etabliert ist. Darüber hinaus wurden drei verschieden starke, dosisabhängige Shear Stress Stimuli induziert, um verschiedene Level an Endothelaktivierung zu simulieren. Im Rahmen der Etablierung und Modifizierung dieses Modells zur Durchführung dieser Studie wurde nach drei Volumina gesucht, die eine nahezu lineare Volumen-Wirkungsbeziehung bei gesunden und unbehandelten Ratten zeigten. Diese konnten schließlich auch ermittelt werden und wurden in dieser Studie eingesetzt. In dieser Arbeit wurde nicht nur die endothelvermittelte Vasodilatation gemessen, sondern auch die vom Endothel unabhängige Dilatation. Diese wurde mit dem NO-Donator Nitroprussid Natrium (NN) durchgeführt, da dieser als endothelunabhängiger Dilatator gut etabliert ist. Um objektiv vergleichen zu können, ist eine valide Quantifizierung unerlässlich. Als Maß der Vasodilatation wurde, wie oben beschrieben, das Integral des Druckabfalls nach Dilatationsinduktion gemessen. Prinzipiell sind auch die Amplitude des maximalen Druckabfalls oder eine Prozentuale Angabe vom Ausgangsniveau möglich. Mittels der Quantifizierung durch die Amplitude kann die für jeden Stimulus und jedes Tier spezifische maximal erreichbare Dilatation ermittelt werden. Der Nachteil dieser Quantifizierungsmethode ist jedoch, dass die Dauer der Dilatation, also der Zeitfaktor, nicht berücksichtigt wird. Für die Beurteilung der Endothelfunktion ist es von großem Interesse, eine Aussage über die Gesamtmenge von endothelial freigesetztem NO während einer Vasodilatation machen zu können. Dies gelingt nicht über die Bestimmung der Amplitude, da dieser Parameter den Faktor „Zeit“ nicht berücksichtigt. Eine prozentuale Angabe über den Druckabfall während einer Vasodilatation, ausgehend vom Basaldruckniveau, berücksichtigt den Zeitfaktor ebenfalls nicht. Es ist von großer Bedeutung, von welchem „Niveau“ aus Gefäße dilatieren. Sind Gefäße

beispielsweise maximal kontrahiert, dann ist die vasodilatative Antwort auf einen bestimmten Stimulus stärker, als beim gleichen Stimulus in relaxiertem Zustand. Um diesen Störfaktor möglichst effektiv zu minimieren, wurden Kriterien bezüglich der vasodynamischen Messung aufgestellt. Zum einen wurde der Fluss im extrakorporalen Kreislauf durch die integrierte Rollerpumpe körperegewichtsadaptiert konstant gehalten. Da es trotz diesen Bedingungen zu idiopathischen Vasospasmen mit Druckerhöhungen in dem zu untersuchenden Gefäßgebiet kommen kann, wurden nur die Ratten in die Studie eingeschlossen, dessen femoraler Basaldruck nicht mehr, als 15 % von 120 mmHg abweicht. Durch diese zwei Maßnahmen konnte sichergestellt werden, dass sich die Gefäße aller gemessenen Tiere in einem vergleichbaren Aktivitätszustand befanden.

2.5.5 Materialien

Material	Bezeichnung	Bezug
Chloralhydrat	K 318.1	Roth, Deutschland
KHS	S-04068	Sigma, Deutschland
Nitroprussid Natrium	Nipruss	Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium 250.000	Ratiopharm, Deutschland
Citratpuffer	0,1 M Na-Citrat in 1l H ₂ O dest.	Sigma, Deutschland
Streptozotozin	SO-130	Sigma Deutschland
Herzkatheter	2,0 french TIP Katheter	Millar Inst., USA
Rollerpumpe	Minipuls 3	Gilson, Frankreich
Respirator	Nagerrespirator 7025	Ugo Basile, Italien
Drucksensor	Pressure Transducer	
Datenerfassungssystem	MacLab 8s	Apple, USA
3-Wege-Hahn	Discofix-3	Braun, Deutschland
Einmalspritze	Injekt-H 1ml	Braun, Deutschland
Kanüle	Microlance 3	Becton Dickinson, Spanien
Pflaster		3M, Deutschland
Polyethylenkatheter	PE Perfusorleitung	Braun, Deutschland
Polyethylenkatheter	G 30402	IVAC, England

Polyethylenkatheter	800/110/140 0,8 mm OD	Portex Limited, England
Polyethylenkatheter	800/110/120 1,09 mm OD	Portex Limited, England
Polyethylenkatheter	800/110/100 0,61 mm OD	Portex Limited, England
Braunüle	Adsyte Pro 388761	Becton Dickinson, Spanien
Silikonschlauch	F 1825113	Gilson, Frankreich
Mikroschere	15000-08	Fine Science Tools, Deutschland
Schere	14074-11	Fine Science Tools, Deutschland
Klingen	10050-00	Fine Science Tools, Deutschland
Katheterhalter	00574-11	Fine Science Tools, Deutschland
Gefäßdilator	18153-11	Fine Science Tools, Deutschland
Pinzette, chirurgisch	11028-15	Fine Science Tools, Deutschland
Gavagesonde	18061-75	Fine Science Tools, Deutschland

2.6 Gewebeaufarbeitung für immunhistologische Analysen

Nach Beendigung der *in vivo* Messungen wurde der linke M. quadriceps entnommen und das Gewebe entsprechend für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen aufgearbeitet. Der M. quadriceps wurde ausgewählt, da er als Träger von arteriellen Gefäßen einen Teil des Endstromgebietes der A. femoralis repräsentiert. Die *in vivo* Ergebnisse und die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen können so am gleichen Organ untersucht werden.

2.6.1 Organentnahme und Organpräparation

Sofort nach Beendigung der *in vivo* Messungen wurde der rechte M. Quadriceps am noch lebenden, narkotisierten Tier freipräpariert. Nach Eröffnung der Muskelfaszien wurde der gesamte Muskel mit Sehnenursprung – und ansatz entnommen und auf Eis

gelagert. Zur Standardisierung wurde ein ca. 3 mm breiter Querschnitt aus der Mitte des Muskels mit einem Skalpell herausgeschnitten. Nach Einbettung in Tissue Tek wurde das Präparat bei -70°C in Flüssigstickstoff gekühltem Methylbutan schockgefroren. Tissue Tek besitzt in gefrorenem Zustand nahezu die gleiche Konsistenz wie das Muskelgewebe. Methylbutan verhindert, dass die Muskelzellmembranen durch das Schockgefrieren in Flüssigstickstoff nicht beschädigt werden.

2.6.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Mit Hilfe des Kryostaten Jung CM 3000 (Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) wurden 5 μm dicke Schnitte des gefrorenen M. Quadriceps angefertigt. Der Kryostat besteht aus einem Rotationsmikrotom, das sich in einer -30° Celsius kalten Gefrierkammer befindet. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden zuvor für 5 Minuten in 10%iges Poly-L-Lysin eingetaucht, um die Haftung des Muskelgewebes auf der Glasfläche des Objektträgers zu erhöhen.

Die Schnitte wurden in serieller Schnittweise aufgetragen, so dass sich auf einem Objektträger Gewebe unterschiedlicher Schnittebenen befand. Es wurden pro Objektträger zwei verschiedene Antigene angefärbt. Durch Eintauchen in eiskaltem Aceton für 10 Minuten wurden die Schnitte fixiert. Sie wurden danach entweder sofort weiterverwendet oder bei -80° Celsius eingefroren.

2.7 Immunhistochemische Färbung

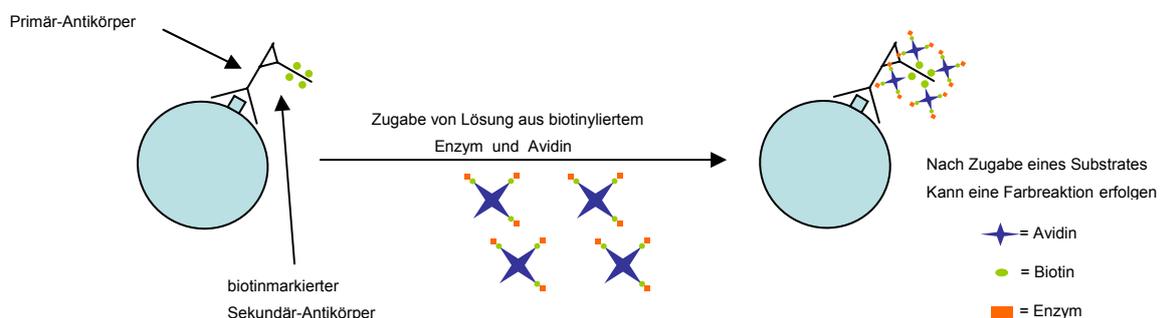
Alle Gefrierschnitte wurden nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) immunhistochemisch gefärbt. Ziel der Färbungen war der Nachweis der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, sowie der Enzyme eNOS und iNOS. Zum Nachweis von ICAM-1 und VCAM-1 wurden monoklonale Antikörper gegen Ratten aus Mäusen verwendet. Zum Nachweis von eNOS und iNOS wurden monoklonale Antikörper gegen Ratten aus Kaninchen verwendet.

2.7.1 Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode):

Diese Methode wurde in den 80er Jahren durch Hsu [99]) entwickelt und gilt auch heute noch als ein herausragendes indirektes Nachweisverfahren histologischer Antigene oder anderer Zellmarker. Sie ist ein Immuno-Peroxidaseverfahren und nutzt die starke Affinität von Avidin, ein aus Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein, zu Biotin. Diese

Bindung besitzt eine der höchsten bekannten biologischen Bindungskonstanten. Sie ist 1.000.000mal höher als die physiologische Antikörper-Antigen-Affinität und ist daher nahezu irreversibel. Nach Bindung des Primärantikörpers bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an das Fc-Fragment. Durch eine anschließende Zugabe von enzymmarkiertem Avidin entsteht eine Enzym-Substrat-Reaktion, die einen Farbnachweis erbringt. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Die für diese Methode verwendeten Sekundärantikörper wurden jeweils mit mehreren Biotinmolekülen konjugiert. Dadurch kommt es zur Bildung von Avidin-Biotin-Komplexen von makromolekularem Ausmaß. Da auch das Gewebe Avidin enthält, muss im ersten Schritt der Färbung dieses endogene Avidin mit Hilfe eines Blocking-Kits geblockt werden. Dies garantiert, dass nur die spezifischen, biotinylierten Antikörper einen Ansatzpunkt für den Avidin-Biotin-Komplex bilden und damit eine hohe Spezifität für das exogen zugeführte Avidin [100].

Figur 4: schematische Darstellung der Avidin – Biotin – Komplex - Methode



2.7.2 Prozedere

Alle Gewebeschnitte wurden mit jeweils 50 µl Avidin-Blocking für 20 Minuten inkubiert. Es folgte ein Waschschrift. Danach wurden die Schnitte mit Biotin-Blocking und Primärantikörper beimpft und für 45 Minuten inkubiert. Es folgt ein weiterer Waschschrift. Nun wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für weitere 45 Minuten inkubiert. Es folgte wieder ein Waschschrift. Anschließend wurde das Präparat mit dem Avidin-Biotin-Komplex beimpft und für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Waschschrift. Die Präparate wurden nun für 12 Minuten in Carbazol gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt.

Dann erfolgte das Deckeln der Schnitte mittels Gelatine. Insgesamt folgten die Färbungen dem folgenden Protokoll:

<u>Arbeitsschritt:</u>	<u>Temperatur:</u>	<u>Inkubationszeit:</u>
30µl Avidin-Blocking in 2,5 ml PBS/FCS	RT in feuchter Kammer	20 min
.....		
2xWaschen in PBS	RT	je 5 min
.....		
Primärantikörper in 2,5 ml PBS/ FCS + 30 µl Biotin-Blocking	RT in feuchter Kammer	45 min
.....		
2xWaschen in PBS	RT	je 5 min
.....		
30µl Sekundärantikörper in 10 ml PBS/FCS	RT in feuchter Kammer	45 min
.....		
2xWaschen in PBS	RT	je 5 min
.....		
ABC-Komplex (30µl Avidin + 30µl Biotin in 5 ml PBS/FCS)	RT in feuchter Kammer	30 min
.....		
2xWaschen in PBS	RT	je 5 min
.....		
Carbazolbad	RT	12 min
.....		
2xWaschen in PBS	RT	je 5 min
.....		
Hämalaun-Färbung	RT	1 min
.....		
2xWaschen in Aqua dest.	RT	je 5 min

2.7.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Alle Gewebsschnitte wurden lichtmikroskopisch ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit ausgewertet und mit einem farbkodierten digitalen Bildanalyseverfahren quantifiziert. Dazu wurden von jedem Präparat 20 Gesichtsfelder in einer 100fachen Vergrößerung eingestellt und mittels einer Videokamera digitalisiert und in ein 704 x 548 Pixel RGB Format mit einer Farbqualität von 16 bit aufgenommen.

2.7.4 Prozedere der farbkodierten, digitalen Bildanalyse

Mit diesem Verfahren ist es möglich, die lichtmikroskopisch erfassten Gesichtsfelder untersucherunabhängig und präzise auszuwerten [101]. Die Bildverarbeitung wurde mit der Software Lucia G digital durchgeführt. Hierzu wurden 2 selbstprogrammierte Makros, eines für flächenhaft und eines für punktförmig exprimierte Antigene, verwendet. Die digitale Bildanalyse erfolgte mit Hilfe der Makros standardisiert und halbautomatisch in drei Stufen [102]:

1. Digitale Erfassung sowie Schärfung und Kontrastierung des mikroskopischen live-Bildes (Abb. 5A).
2. Manuelles Umrahmen der Bildfläche, die das Bildanalyseprogramm bei seinen Messungen berücksichtigen soll. Dadurch wird die Größe der Messfläche A_M einer Messung festgelegt (Abb. 5B).
3. Automatische Messung von drei Flächen: Zunächst erfolgt die Messung der Messfläche A_M und anschließend Messung der Hintergrundfläche A_H , die nicht von Muskelgewebe bedeckt ist (Abb. 5C). Schließlich Messung der dunkelrot gefärbten Antigenfläche A_A (Abb. 5E).
4. Die Daten der Messungen aller Gesichtsfelder eines Muskelschnitts wurden aus dem Bildanalyseprogramm in ein Daten verarbeitendes Microsoft Excel Makro exportiert, das die Expression E_A der Flächenantigene pro Muskelgewebefläche nach folgender Formel berechnete:

$$E_A = \sum_{i=1}^n \frac{A_A}{A_M - A_H} \quad n = \text{Anzahl der Gesichtsfelder}; [E_A] = \text{mm}^2 / \text{mm}^2.$$

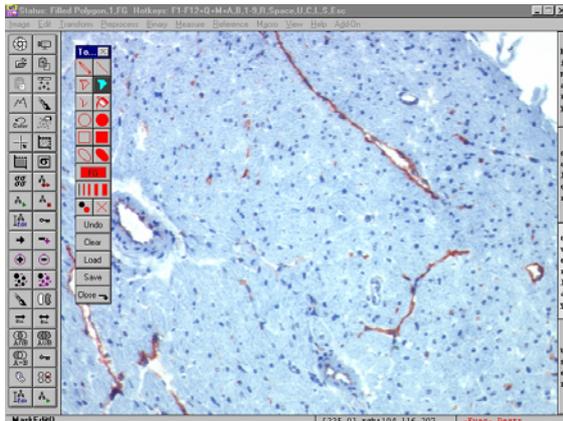
Flächenhaft ausgewertet wurden die Antigene ICAM-1, VCAM-1, eNOS und iNOS. Eine Konvertierungssoftware wurde zudem benutzt, um die berechneten Antigenexpressionen automatisch in eine Datentabelle zusammenzutragen.

Die bei der oben beschriebenen Stufe 3 der digitalen Bildanalyse verwendeten Farbschwellenwerte wurden durch das Setzen von mehreren repräsentativen Punkten innerhalb der erfassten Bilder von 10 zufällig ausgewählten immunhistochemisch gefärbten Herzschnitten bei standardisierter Beleuchtung gemäß Köhler festgelegt. Die resultierenden RGB Schwellenwerte, also die Minimal- und Maximalwerte der roten, grünen und blauen Datenflächen der Farbtransformation, wurden im jeweiligen Bildanalyse-Makro ausgeführt. Weiterhin wurden die Makros so programmiert, dass nach dem manuellen Festlegen der Messfläche die dritte Stufe der Bildanalyse automatisch abläuft, ohne die Möglichkeit, Einflussnahme auf die ablaufenden Messungen (halb-automatischer Modus).

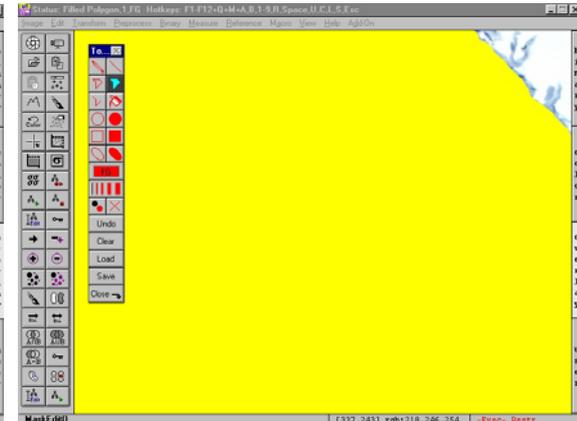
Die mikroskopischen Bilder zur Quantifizierung der detektierten Flächen und Infiltrate wurden bei 200facher Vergrößerung erfasst. Im Falle der Infiltrate wäre zwar die Sensitivität der Chromogen-Erkennung bei 100facher Vergrößerung ausreichend gewesen, für die Trennung der einzelnen Infiltrathaufen war jedoch eine 200fache Vergrößerung erforderlich. Die Menge an Adhäsionsmolekülen und Enzymen wurde in Flächenfraktion angegeben (area fraction, AF). Die AF beschreibt den prozentualen Anteil an spezifisch angefärbten Flächen in Bezug auf die Gesamtfläche des Skelettmuskelgewebes.

Figur 5: Erkennung von flächenhaft exprimierten Antigenen. Beispiel mit ICAM-1. Der 200x vergrößerte Gewebssausschnitt wird digital erfasst, geschärft und kontrastiert aufgenommen (Bild A). Bestimmung der zu messenden Fläche durch deren manuelles Umrahmen und Ausfüllen mit gelber Farbe (Bild B). Messung der weißen Hintergrundfläche, die nicht durch Gewebe bedeckt ist, durch Markierung mit gelber Farbe (Bild C und als binäre Darstellung in Bild D). Messung der dunkelrot gefärbten Fläche, die gelb markiert ist (Bild E und als binäre Darstellung in Bild F).

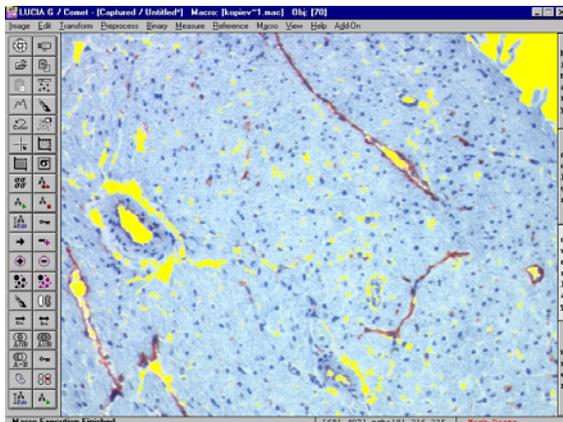
A



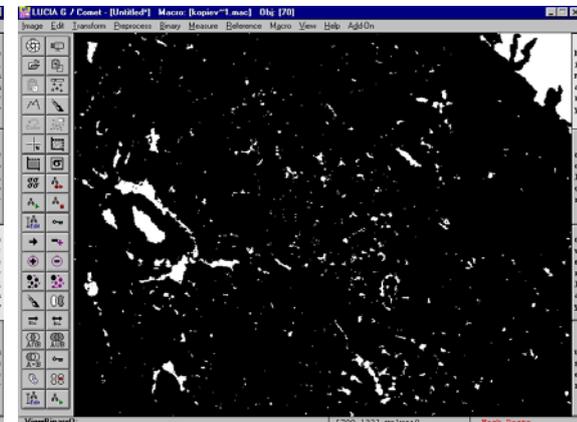
B



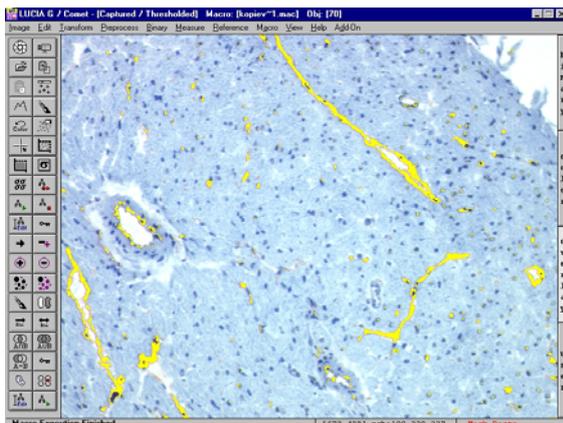
C



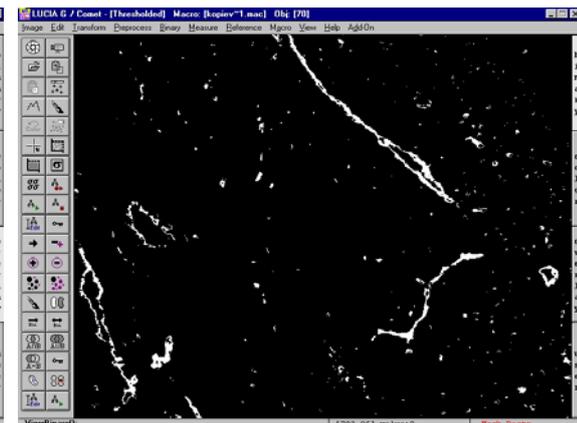
D



E



F



2.7.5 Auswahl des Gewebes und der gemessenen Parameter

Ziel der Analyse des Muskelgewebes war es zum einen, Marker für ein inflammatorisches Geschehen, wie es die Atherosklerose ist, zu untersuchen. Hierfür wurden die endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 gewählt. Sie zeigten den Grad der Endothelaktivierung im Rahmen der Inflammation an. Zum anderen

sollten Marker der NO Regulation quantifiziert werden. Hier wurden die beiden Enzymsubtypen eNOS und iNOS gewählt. Die Möglichkeiten der Beeinflussung dieser beiden Subtypen sind hochkomplex und an vielen Stellen noch nicht verstanden. Das unmittelbare Resultat dieser Beeinflussung wirkt dagegen geradezu stereotyp: es kommt entweder zu einer Aktivierung oder zu einer Inhibierung der NO-Produktion, welche dann wieder hochkomplexe Konsequenzen für den Organismus haben. Somit erscheinen eNOS und iNOS als geeignete Marker für Veränderungen in Bezug auf die NO-Produktion. Die Messung dieser 4 Parameter erfolgte über die immunhistochemische Färbung und semiquantitative Auswertung mittels digitaler Bildanalyse. Durch die Verwendung der immunhistochemischen Methode konnten von ein und demselben Herzen sehr viele Schnitte angefertigt und auf verschiedene Antigene untersucht werden. Diese Methode ermöglichte es auch im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden, die Lokalisation der jeweiligen Expressionsmuster zu identifizieren. So konnte beispielweise die Expression in Muskelzellen von der Expression in Endothelzellen unterschieden werden. Die ABC-Methode schien aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität und Spezifität, wodurch auch die Detektion sehr geringer Antigenexpressionen möglich ist, z.B. die von iNOS und VCAM-1 bei der SD Tiergruppe, die am besten geeignete. Die digitale Bildanalyse ist eine standardisierte Methode zur halbautomatischen Quantifizierung von Infiltraten und Zelladhäsionsmolekülen. Sie erlaubt eine semiquantitative Erfassung der Expression der einzelnen Antigene und ist vom jeweiligen Untersucher unabhängig [101].

2.7.6 Verwendete Materialien für die Gewebepreparation und die Färbung

Material	Bezeichnung	Bezug
Hämalaun	Hämalaun nach Mayer	Sigma-Aldrich, Deutschland
Carbazol-Lösung	3-Amino-9-Ethylcarbazol	Merck, Deutschland
Dimethylformamid	NN-Dimethylformamid	Merck, Deutschland
Gelatine	Kaiser`s Gelatine	Merck, Deutschland
Blocking-Kit	Avidin-Blocking-Kit	Vector, USA
Blocking-Kit	Biotin-Blocking-Kit	Vector, USA
Avidin-Biotin-Komplex	Elite Vectastatin (Maus IgG)	Vector, USA

Primärantikörper	Anti-Ratten-ICAM-1 aus Maus (1:100)	Serotec, England
Primärantikörper	Anti-Ratten-VCAM-1 aus Maus (1:50)	Serotec, England
Primärantikörper	Anti-Ratten-iNOS aus Hase (1 :50)	Alpha Diagnostics, USA
Primärantikörper	Anti-Ratten-eNOS aus Hase (1:50)	Alpha Diagnostics, USA
Sekundärantikörper	Biotinylierter Anti-Maus-IgG-AK aus Ziege (1:400)	Dianova, Deutschland
Sekundärantikörper	Biotinylierter Anti-Hase-IgG-AK aus Ziege (1:333)	Dianova, Deutschland
Lichtmikroskop	DMRD	Leica, Deutschland
3-Chip-Digital-Camera	Colour Vision Module XC-00P	Donpisha, Japan
Tissue Tek	O.C.T. Compound	Sakura, Niederlande
Methylbutan		Merck, Deutschland
Flüssigstickstoff		Messer-Griesheim, Deutschland
Poly-L-Lysin		Sigma, Deutschland
Aceton		Merck, Deutschland

2.8 Statistische Auswertung

Für eine zufallskritische Absicherung der beobachteten Werte ist die Anwendung statistischer Testverfahren unerlässlich. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der JMP Statistical Discovery Software™ Version 4.0.2 (SAS Institute, NC, USA). Für die verwendeten Tests wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ als signifikantes Ergebnis gewertet. Eine statistische Auswertung der Gruppenunterschiede erfolgte mittels der two way ANOVA (Analysis of Variance) Prozedur. Die ANOVA ist an folgende Voraussetzungen geknüpft: die Fehlerkomponenten müssen normalverteilt

sein, die Fehlervarianzen müssen homogen sein und die Fehlerkomponenten müssen von einander unabhängig sein. Nachdem die ANOVA Prozedur signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachwies, wurde als Post-HOC Test für die Daten aus der Gefäßfunktionsmessung der student's t-Test und für die Daten aus der immunhistologischen Quantifizierung der Tukey-Kramer Test angewandt, da die Varianzen der einzelnen Variablen unterschiedlich waren. Alle in dieser Arbeit erhobenen Werte werden als Mittelwert (MW) \pm des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) angegeben. Die aus dem Post-HOC Test resultierende Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wird durch „ $p < 0,05$ “ angegeben. Besteht kein signifikanter Unterschied, wird dies mit „n. s.“ (nicht signifikant) angegeben.