

Aus dem Institut für Physiologie
des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Etablierung eines Modells
zur Untersuchung koronarer Regulationsmechanismen
prä- und postkapillärer Mikrogefäße in situ
mittels Video-Fluoreszenzmikroskopie.
Druckinduzierte Reaktionen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stephanie Goebel
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2702

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Hartmann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Habazettl

Dritter Prüfer: PD Dr. P. Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

coronary vessels, regulation, blood flow, pressure, vasodilation, vasoconstriction,
laboratory animal, rats, fluorescence microscopy

Tag der Promotion: 25.04.2003

Meiner großen Familie

INHALT

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Klinische Aspekte koronarer Mikrozirkulation	3
2.2	Heterogenität der koronaren Mikrozirkulation	3
2.3	Funktionelle und histologische Einteilung der Gefäße	4
2.4	Wichtige Gesetze der Blutflussregulation	6
2.5	Regulationsmechanismen koronarer Widerstandsgefäße	6
2.5.1	Metabolische Kontrolle	8
2.5.2	Myogene Kontrolle	9
2.5.3	Endotheliale Kontrolle	11
2.5.4	Neurogene Kontrolle	12
2.6	Regulationsmechanismen koronarvenöser Gefäße	12
2.7	Bisherige Methoden zur Visualisierung koronarer arteriolärer Gefäße	13
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	15
3.1	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1.1	Anforderungen an die zu etablierende, neue Methode	15
3.1.2	Prinzip der Methode	15
3.1.2.1	Modifizierte Methodik isoliert perfundierter Herzen nach Langendorff	15
3.1.2.2	Arretierung des Herzens durch Tetrodotoxin	15
3.1.2.3	Fluoreszenzmikroskopie	16
3.1.3	Perfusionsapparatur	16
3.1.4	Mikroskopischer Aufbau und Auflichtfluoreszenzmikroskopie (Epiillumination)	20
3.1.4.1	Etablierung der Mikroskopie	22
3.1.5	Bestimmung der Gefäßdurchmesser	23
3.1.6	Gemessene und berechnete Parameter	24
3.1.7	Statistik	25
3.1.8	Versuchstiere	25
3.1.9	Narkose und Präparation	26
3.1.10	Beurteilung der Stabilität des Modells	26

3.1.11	VORVERSUCHE	27
3.1.11.1	Änderungen des Perfusionsdruckes	27
3.1.11.2	Änderungen des Perfusionsdruckes nach Arretierung durch Tetrodotoxin	28
3.1.11.3	Änderungen des Perfusionsdruckes nach Maximaldilatation durch Dipyridamol	28
3.1.11.4	Abhängigkeit des Flusses von der Gewebeoxygenation	28
3.1.11.5	Dosisabhängige Flussteigerung durch Adenosin	28
3.1.11.6	Dosisabhängige Flussteigerung durch Nitroprussid-Natrium	28
3.1.11.7	Kontrollversuche zu den Vorversuchsgruppen	29
3.1.12	HAUPTUNTERSUCHUNGEN	29
3.1.12.1	Versuchsablauf während der Organperfusion bei offenem System	29
3.1.12.2	Versuchsablauf während der Rezirkulation	29
3.1.12.3	Versuchsgruppen zur ersten Hypothese (Arteriolen)	31
3.1.12.4	Versuchsgruppen zur zweiten Hypothese (Venolen)	32
3.2	ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE	33
3.2.1	Änderungen des Perfusionsdruckes	33
3.2.2	Änderungen des Perfusionsdruckes nach Arretierung durch Tetrodotoxin	35
3.2.3	Änderungen des Perfusionsdruckes nach Maximaldilatation durch Dipyridamol	36
3.2.4	Abhängigkeit des Flusses von der Gewebeoxygenation	36
3.2.5	Dosisabhängige Flussteigerung durch Adenosin	36
3.2.6	Dosisabhängige Flussteigerung durch Nitroprussid-Natrium	40
3.2.7	Kontrollversuche zu den Vorversuchsgruppen	42
3.3	ERGEBNISSE DER HAUPTUNTERSUCHUNGEN	43
3.3.1	Untersuchungen von Arteriolen – Hypothese 1	43
3.3.1.1	Gemessene und berechnete hämodynamische und metabolische Parameter	43
3.3.1.2	Durchmesseränderung koronarer, arteriöler Einzelgefäße während unterschiedlicher Perfusionsdrücke innerhalb der Gruppe 'PPArt'	45
3.3.1.3	Durchmesseränderungen koronarer, arteriöler Einzelgefäße während unterschiedlicher Perfusionsdrücke innerhalb der Gruppe 'PAP+SNP'	48
3.3.1.4	Gruppenübergreifender Vergleich der Gesamtdurchmesseränderungen ($\Delta\%$)	51
3.3.1.5	Vergleich der Gesamtdurchmesseränderungen innerhalb einer Gruppe nach Einteilung in Arteriolen mit einem Ausgangsdurchmesser $< 10 \mu\text{m}$ und $> 10 \mu\text{m}$	53
3.3.1.6	Einzelflussverlauf, Steigung (b_1) und Regression (r^2) der Druck-Flussbeziehung innerhalb der Gruppen 'PPArt', 'PAP+SNP' und 'PPArtKontrolle'	55

3.3.1.7	Berechnung der Widerstandsänderungen	56
3.3.1.8	Widerstandsänderungen der Einzelgefäße während unterschiedlicher Perfusionsdrücke innerhalb der Gruppe 'PPArt'	57
3.3.1.9	Widerstandsänderungen der Einzelgefäße während unterschiedlicher Perfusionsdrücke innerhalb der Gruppe 'PAP+SNP'	60
3.3.1.10	Gruppenübergreifender Vergleich der Gesamtwiderstandsänderungen ($\Delta\%$)	63
3.3.1.11	Vergleich der Gesamtwiderstandsänderungen innerhalb einer Gruppe nach Einteilung in Arteriolen mit einem Ausgangsdurchmesser $< 10 \mu\text{m}$ und $> 10 \mu\text{m}$	65
3.3.2	Untersuchungen von Venolen – Hypothese 2	67
3.3.2.1	Gemessene und berechnete hämodynamische und metabolische Parameter	67
3.3.2.2	Durchmesseränderungen der Einzelgefäße während unterschiedlicher Drücke des rechten Vorhofs innerhalb der Gruppe 'Venolen'	68
3.3.2.3	Gruppenübergreifender Vergleich der Gesamtdurchmesseränderungen ($\Delta\%$)	72
4	DISKUSSION	74
4.1	Methodik	74
4.1.1	Narkose und Präparation	74
4.1.2	Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff	74
4.1.3	Arretierung der Herzen mittels Tetrodotoxin	76
4.1.4	Mikroskopie und Durchmesserbestimmung	76
4.1.5	Versuchsprotokoll	77
4.2	Ergebnisse	78
4.2.1	Die myogene Regulationsbreite terminaler, koronarer Arteriolen	78
4.2.1.1	Gruppenvergleich	78
4.2.1.2	Mögliche Ursachen segmentaler Unterschiede	80
4.2.2	Die myogene Regulationsbreite postkapillärer, koronarer Venolen	82
4.2.3	Gesamtbetrachtung und Ausblick	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	SUMMARY	87
7	LITERATURVERZEICHNIS	89
8	ANHANG	94

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADO	Adenosin
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule (cmH ₂ O x 0,098 = kPa)
CO ₂	Kohlendioxyd
D	Durchmesser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
IE	Internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
KHL	Krebs-Henseleit-Lösung
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MgCl ₂ x6H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (mmHg x 0,133 = kPa)
mmol	Millimol
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxyd
O ₂	Sauerstoff
Pa	Pascal
PAP	Papaverin
pCO ₂	Kohlendioxyd-Partialdruck
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PP	Perfusionsdruck
Q	Fluss

r	Radius
R	Widerstand
s	Sekunde
$s_{\bar{x}}$	Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
SNP	Nitroprussid-Natrium
t	Zeit
TTX	Tetrodotoxin
V.	Vena
Vv.	Venae
Vol. %	Volumenprozent
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

8 ANHANG

BISLANG VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT

Kongressbeiträge: Vorträge und Abstrakts

Goebel S, Kübler WM, Pries AR, Kuppe H, Habazettl H (2001)

A new model for fluorescence video microscopy of coronary terminal arterioles in situ, Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie: Abstracts and Papers, Frankfurt am Main, im Druck

Goebel S, Kübler WM, Pries AR, Kuppe H, Habazettl H (2002)

Responses of coronary terminal arterioles to changes in perfusion pressure; results of a new video microscopic in situ approach, Deutsche Physiologische Gesellschaft: Abstracts of the annual meeting, Tübingen, Pflügers Arch/ Eur J Physiol 443 (*Supplement*), S259

Goebel S, Kuebler WM, Pries AR, Kuppe H, Habazettl H (2002)

A new model for fluorescence video microscopy of coronary terminal arterioles in situ: effects of perfusion pressure, Eur Surg Res 34 (*Supplement 1*), 7

Goebel S, Kübler WM, Pries AR, Kuppe H, Habazettl H (2002)

Coronary terminal arteriole responses to changes in perfusions pressure: results from a new video microscopy approach to isolated hearts, Eur Heart J 23 (*Abstract Supplement*), 15

Habazettl H, **Goebel S**, Kuebler W, Kuppe H, Pries AR (2002)

Differential myogenic control of coronary terminal arterioles: results from a new model of fluorescence microscopy on isolated hearts, American society of anesthesiologists: Abstracts of Scientific Papers, Orlando, Anaesthesiology 96: A652

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Habazettl durchgeführt. Ihm danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Für die sehr gute fachliche Betreuung und seine stets spontane Bereitschaft zu ausführlichen, kritischen Diskussionen bin ich ihm sehr verbunden.

Herrn Univ.- Prof. Dr. H. Hartmann danke ich sehr für sein Vertrauen bei der Übernahme der Dissertation als Erstgutachter und für die sehr gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit. Seine konstruktiven, fachlichen Hinweise auf zu berücksichtigende, inhaltliche Teilaspekte haben entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen.

Frau PD Dr. P. Reinhold danke ich sehr für die äußerst gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit und ihre Ratschläge im Hinblick auf zukünftige Publikationen.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter der AG Pries und an Herrn Prof. Dr. A.R. Pries selbst für die entgegengebrachte Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. J. Werner für die Einweisung in die Programme Excel und SimaPlot, an Frau U. Hilse für das zahlreiche „Röhre halten“ und die Motivation an der Gertrude, an Frau B. Reglin und Frau Dr. A. Cornelissen für zahlreiche, anregende Diskussionen, an Herrn Dräger für seine exakten Konstruktionen und seine spontane, großzügige Hilfsbereitschaft, an Frau S. May, Herrn J. Lindert und Herrn Dr. med. M. Bongrazio und Herrn Dr. L. Da Silva-Azevedo für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Brandis danke ich sehr für ihre Hilfe bei der Literaturbeschaffung und die freundliche Beantwortung meiner Fragen zum Literaturverzeichnis.

Herrn Wiesatty, Herrn Wiedemann und Herrn Breuer danke ich für die Betreuung der Laboriere und das gute Verhältnis im Rahmen meiner Aufgabe als die Tiere betreuende Tierärztin.

Dem Institut für Biometrie und besonders Frau Dipl.-Stat. R. Schmitz danke ich für die konstruktiven Vorschläge bei der Auswertung und der Darstellung der ermittelten Daten.

Herrn Wendland danke ich für die zahlreichen Ratschläge im Umgang mit der Formatvorlage für digitale Dissertationen.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Der Firma Medtronic danke ich für die freundliche Bereitstellung der Minioxygenatoren.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich ganz besonders für ihre große, liebevolle Unterstützung und den bedenkenlosen Zuspruch bei jedem Kurswechsel.

Guido danke ich für die ständige Kraft.

LEBENS LAUF

Stephanie Goebel

Geburtsdatum/-ort

23. November 1971 in Berlin

Eltern

Sabine Goebel, geb. Möller, Physiotherapeutin

Hermann Goebel, Dipl.-Wirtsch. Ingenieur

Schul Ausbildung

1978-1982	St. Peter Grundschule, Rheinberg
1982-1988	Amplonius Gymnasium, Rheinberg
1988-1989	Otsego-High-School, Bowling Green, Ohio, USA
1989-1991	Oberstufe, Amplonius Gymnasium, Rheinberg
1991	Abitur, Amplonius Gymnasium, Rheinberg

Studium

1992-1994	Grundstudium und Zwischenprüfung in den Fächern Anglistik und Germanistik, Universität zu Köln
1994-1996	1. bis 4. Semester Veterinärmedizin an der Allatorvostudományi Egyetem, Budapest; Physikum
1996	5. und 6. Semester Veterinärmedizin an der Freien Universität, Berlin
1997	Erstes Staatsexamen, FU-Berlin
1997-1998	7. und 8. Semester Veterinärmedizin an der Universität Zürich, Schweiz
1998	Zweites Staatsexamen, FU-Berlin
1998-2000	9. bis 11. Semester Veterinärmedizin an der Freien Universität, Berlin, Drittes Staatsexamen, FU-Berlin
03/ 2000	Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeit

05/00 – 09/02	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Physiologie der Freien Universität, Berlin (Prof. Dr. H. Habazettl, Prof. Dr. A.R. Pries); zuständige Tierärztin für die Betreuung der Tiere des institutseigenen Tierstalles
---------------	---

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur erstellt habe.

Berlin, den 29. Januar 2003

Stephanie Goebel