

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Experimentelle Untersuchungen zur Hämodynamik & kardiovaskulären Schäden einer Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonie in Rag-1^{-/-} Mäusen.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Herrn Jonas Leonhard Thiele

geboren am 09.09.1990 in Hamburg

Hamburg 2015

**Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 01.03.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Wenzel

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Physiologie und Pathophysiologie des Blutdruckes.....	1
1.1.1. Aufbau und Funktion der Arterien	3
1.1.2. Blutdruckregulation	3
1.1.2.1. Kurzfristige Mechanismen	4
1.1.2.2. Mittelfristige Mechanismen	4
1.1.2.3. Langfristige Mechanismen.....	9
1.2. Entzündliche Genese der arteriellen Hypertonie	10
1.2.1. Das Immunsystem	10
1.2.1.1. Angeborenes Immunsystem.....	10
1.2.1.2. Adaptives Immunsystem	11
1.2.1.3. Spezifische Oberflächenmarker	11
1.2.1.4. Subtypen der T-Lymphozyten	12
1.2.1.5. Reaktive Sauerstoffspezies & Angiotensin-II.....	13
1.1.2. Adaptives Immunsystem & Hypertonie	14
1.3. Zielsetzung	14
2. Material & Methodik	15
2.1. Tierversuch.....	15
2.1.1. Verwendete Mauslinien.....	15
2.1.1.1. Rag1tm1Mom (Rag-1 ^{-/-})	15
2.1.1.2. C57BL/6J.....	16
2.1.2. Haltung	16
2.1.3. Ernährung	17
2.1.4. Mausvisite	17
2.2. Ablauf des Experiments.....	17
2.2.1. Schema und Endpunkte.....	17
2.3. Genotypisierung	18
2.3.1. Probengewinnung	18
2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
2.3.3. Agarosegelelektrophorese	20
2.4. Radiotelemetrische Blutdruckmessung	20
2.4.1. Messparameter	20
2.4.2. Messinstrument.....	20
2.4.3. Computerprogramm.....	21
2.4.4. Messintervalle	22
2.5. Operationen.....	23
2.5.1. Hygiene.....	23
2.5.2. Telemetriesenderimplantation.....	24
2.5.2.1. Sendervorbereitung.....	24
2.5.2.2. Anästhesie.....	24
2.5.2.3. Vorbereitung und Lagerung.....	24
2.5.2.4. Eingriff	25
2.5.2.5. Postoperative Phase	26
2.5.3. Subkutane Implantation der osmotischen Minipumpe.....	26
2.5.3.1. Anästhesie.....	27
2.5.3.2. Eingriff	28
2.5.3.3. Postoperative Phase	28

2.6.	Histologie, Molekularbiologie & FACS	28
2.6.1.	Organentnahme	28
2.6.2.	Ventrikelgewicht	29
2.6.3.	Histologie	29
2.6.3.1.	Herz	29
2.6.3.2.	Aorta	31
2.6.4.	Relaxationsfähigkeit der Aorta im Myographen	31
2.6.4.1.	Untersuchte Parameter	32
2.6.4.2.	Myographie	32
2.6.4.3.	Vorbereitung der Aorten	33
2.6.4.4.	Aufbau des Myographen	33
2.6.4.5.	Messung	34
2.6.5.	Analyse des Bluts bezüglich Zellpopulation mit FACS	34
2.6.5.1.	Aufbau & Funktionsweise des Durchflusszytometers	35
2.6.5.2.	Probenvorbereitung	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Vorwort zur Statistik	38
3.2.	Genotypisierung	39
3.3.	FACS	39
3.4.	OP-Erfolg	40
3.5.	Mausvisiten	40
3.6.	Telemetrie	42
3.6.1.	Körperliche Aktivität	42
3.6.2.	Herzfrequenz	44
3.6.2.2.	Aktivitätsnormierte HF	49
3.6.3.	Blutdruck	51
3.6.3.1.	Mittlerer arterieller Blutdruck	51
3.6.3.3.	Aktivitätsnormierter MAP	56
3.6.3.4.	Systolischer Blutdruck	57
3.6.3.5.	Diastolischer Blutdruck	58
3.6.3.6.	Blutdruckamplitude	59
3.7.	Endorganschäden	60
3.7.1.	Aorta	60
3.7.1.1.	Gefäßfunktion	60
3.7.1.2.	Histopathologie	63
3.7.2.	Herz	65
3.7.2.1.	Gewicht	65
3.7.2.2.	Histopathologie	66
4.	Diskussion	67
4.1.	Methodikdiskussion	67
4.1.1.	Genotyp und Phänotyp	67
4.1.2.	Verwendete Mauslinien und deren Haltung	67
4.1.3.	Telemetrie	68
4.1.4.	Erzeugung arterieller Hypertonie durch Angiotensin-II Infusion	69
4.1.5.	Histologische Untersuchungen	69
4.1.5.1	PSR-Score	69
4.1.5.2.	Mediafläche der Aorta	69

4.2. Ergebnisdiskussion.....	70
4.2.1. Körperliche Aktivität	70
4.2.2. Herzfrequenz	70
4.2.3. Blutdruck & Gefäßschäden	71
4.2.3.1. Überblick	71
4.2.3.2. Superoxid Theorie, Lymphozytäre NADPH Oxidase und Neoantigenformierung	72
4.2.3.3. Gefäßmorphologie und –Relaxationsfähigkeit	74
4.2.3.4. Weiterführende Fragestellungen & Erklärungsansätze für Ergebnisdiskrepanzen	76
4.2.3.5. Potenzielle methodische Fehlerquellen	78
4.2.4. Myokardiale Hypertrophie und Fibrose	79
5. Zusammenfassung	82
6. Abkürzungsverzeichnis.....	84
7. Literaturverzeichnis.....	85
8. Abbildungsverzeichnis.....	94
9. Tabellenverzeichnis.....	95
10. Danksagung	96
11. Lebenslauf	97
12. Eidesstattliche Versicherung.....	98

1. Einleitung

Die genauen Pathophysiologien der arteriellen Hypertonie sind bis heute nicht genau bekannt. Nur in etwa 5% der Fälle lässt sich eine sekundäre Hypertonie eruieren. Erkrankungen, welche sekundär eine Hypertonie bedingen sind u.a. Nierenarterienstenosen, Morbus Cushing oder ein Phäochromozytom. In diesen Fällen findet sich ein eindeutig anatomisch-physiologisches Korrelat als Ursache. Die restlichen ca. 95 % der Hypertoniepatienten zeigen nach Ausschluss einer sekundären Hypertonie eine primär essentielle Hypertonie. Die Lebenszeitprävalenz für die Hypertonie (Blutdruck >140/90 mmHg) in Industrienationen übersteigt 90%. Querschnittsstudien zeigen bei 60% der über 18 jährigen Bevölkerung der USA erhöhte Blutdruckwerte oder eine manifeste Hypertonie [Wang und Wang 2004]. Ein unbehandelter Bluthochdruck kann innerhalb kurzer Zeit u.a. zu Herzerkrankungen (z.B. linksventrikuläre Hypertrophie), Nierenerkrankungen (z.B. Mikroalbuminurie, Nephrosklerose) und verbunden mit einer Hyperlipidämie zu einer allgemeinen Atherosklerose führen. Ein über Jahre unentdeckter Hypertonus stellt einen starken Risikofaktor für teils fatale Ereignisse wie zerebrale Insulte oder Myokardinfarkte dar [Messerli, et al. 2007; Lewington, et al. 2002].

1.1. Physiologie und Pathophysiologie des Blutdruckes

Als Blutdruck wird der in Gefäßen des Blutkreislaufs herrschende Druck bezeichnet. Im gebräuchlichen Sinne ist der Blutdruck einer relativ herznahen Arterie des großen Blutkreislaufes gemessen gegenüber dem atmosphärischen Luftdruck gemeint (Arterieller Blutdruck). Der Blutdruck des Lungenkreislaufs stellt beispielsweise einen besonderen Parameter dar, welcher bei einigen Fragestellungen auch untersucht wird (Pulmonalarterieller Blutdruck).

Im Allgemeinen stellt die Druckdifferenz zwischen dem arteriellen und venösen Stromgebiet die hämodynamische Triebkraft für die Blutzirkulation dar. Physiologisch betrachtet errechnet sich der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) nach dem Ohm'schen Gesetz ($U = R \times I$) aus dem Produkt des totalen peripheren Widerstandes (TPR), der nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille in der 4. Potenz umgekehrt proportional zum aktuellen Querschnittsradius der Widerstandsgefäße (Arteriolen) ist, und dem Herzzeitvolumen (HZV), dem Produkt aus Schlagvolumen (SV) und Herzfrequenz (HF), zuzüglich des zentral venösen Druckes (ZVD):

Ohm'sches Gesetz

$$U = R \times I$$

Ohm'sches Gesetz bezogen auf den Blutkreislauf

$$\Delta p (U) = TPR (R) \times HZV (I)$$

$$MAP - ZVD = TPR \times HF \times SV$$

$$MAP = HF \times SV \times TPR + ZVD$$

Während der Auswurfphase des Herzens erreicht der Blutdruck in den Arterien ein Maximum (systolischer Blutdruck) und fällt während der Diastole auf ein Minimum ab (diastolischer Blutdruck). Der mittlere arterielle Druck (MAP) errechnet sich aus dem Integral der Druckpulscurve. Näherungsweise gilt: $MAP = 1/3(P_{sys} - P_{Dia}) + P_{Dia}$.

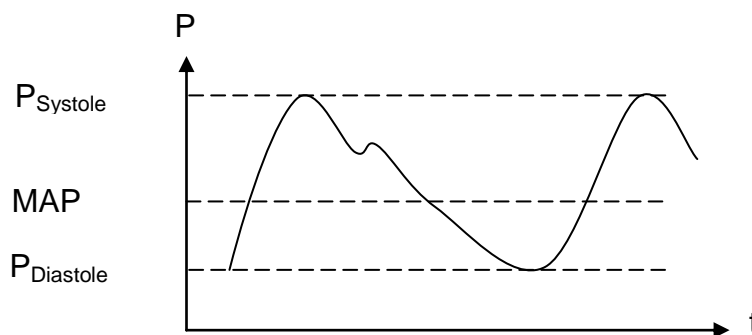


Abbildung 1-1: Schema, Arterieller Druckpuls (modifiziert nach H. Ehmke in "Physiologie; Klink, Pape, Kurtz, Silbernagl; 2009, 6. Auflage, S.183)

Die physiologische Regulation des Blutdrucks erfolgt über eine Vielzahl humoraler, nervöser und metabolischer Faktoren, welche eine Wirkung auf die periphere Vasomotorik und/oder das Herzzeitvolumen gemeinsam haben. Einige Faktoren haben weiterhin eine indirekte Auswirkung auf das HZV durch Elektrolyt- und Volumenverschiebungen. Das richtige Zusammenspiel dieser zahlreichen regulatorischen Mechanismen stellt die adäquate Gewebedurchblutung sicher [Guyton 1991]. Pathologische Veränderungen dieser physiologischen Stellglieder treten bei der arteriellen Hypertonie in Erscheinung. In den meisten Fällen der Hypertonie ist der TPR erhöht [Tang, et al. 2003].

1.1.1. Aufbau und Funktion der Arterien

Die Wand der Arterien besitzt einen dreischichtigen Aufbau aus Tunica interna (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia). Die zum Lumen begrenzende Schicht ist die Intima, bestehend aus einer Schicht Endothelzellen, welche für die Blutdruckregulation von großer Bedeutung sind. So wirken parakrine Faktoren der Endothelzellen auf die in der Media lokalisierte glatte Muskulatur. Die glatte Muskulatur wirkt durch Konstriktion bzw. Relaxation auf den Vasotonus und die Gefäßweite, was wiederum den TPR und darüber den MAP beeinflusst. Zu den vom Endothel sezernierten vasokonstriktorisches wirkenden Substanzen zählen u.a. Endothelin und Thromboxan A₂ [Katusic, et al. 1988; Kiowski, et al. 1991]. Vom Endothel sezernierte Vasodilatorika sind u.a. Prostacyclin PGI₂, Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF, Stickstoffmonoxid, NO) und Bradykinin [Moncada, et al. 1976; Parsons, et al. 1991; Furchgott und Vanhoutte 1989]. Ein Beispiel für den Einfluss der Endothelfunktion auf den MAP ist, dass Mäuse mit genetischem Defekt der endothelständigen NO-Synthase eine arterielle Hypertonie entwickeln [Huang, et al. 1995].

Die Aktivität der kontraktile Elemente (Aktin und Myosin) der glatten Muskulatur in der Media ist abhängig vom intrazellulären Ca²⁺-Gehalt. Intrazelluläres Ca²⁺ bildet mit Calmodulin einen Komplex, der die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLK) aktiviert. Die MLK phosphoryliert die leichten Myosinketten und ermöglicht dadurch eine folgende Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten [Somlyo und Somlyo 1994]. Der intrazelluläre Ca²⁺ Gehalt wird durch Ca²⁺ Kanäle und Transporter an Zellmembran und sarkoplasmatischem Retikulum reguliert. Die Kanäle unterliegen der Regulation durch endokrine und parakrine Faktoren wie z.B. Endothelin, Angiotensin-II, NO, Thromboxan, Noradrenalin, sowie deren intrazelluläre Secondmessenger cAMP und cGMP.

1.1.2. Blutdruckregulation

Im Folgenden werden die wichtigsten Regulationsmechanismen des Blutdruckes in kurzer Form beschrieben. Man kann hierbei die Unterscheidung in Kurz-, Mittel- und langfristige Mechanismen treffen.

1.1.2.1. Kurzfristige Mechanismen

Vegetatives Nervensystem

Die kurzfristige Regulierung des Blutdrucks erfolgt hauptsächlich durch das vegetative Nervensystem. Arterien und Arteriolen sind durch sympathische Nervenendigungen innerviert. Deren Neurotransmitter Noradrenalin wirkt vasokonstriktiv und erhält den vaskulären Grundtonus aufrecht [Julien, et al. 1995].

Pressorezeptorenreflex

Die schnellsten integrativen Leistungen (wenige Sekunden) erfüllt das arterielle Barorezeptorsystem [Guyton 1991]. Barorezeptoren in Sinus caroticus, Arcus aortae und Pulmonalkreislauf lösen bei plötzlicher Blutdruckerhöhung den Pressorezeptorenreflex aus. Bei Erhöhung der Wandspannung senden die Rezeptoren afferente Signale, die über die Nervi vagi und glossopharyngei in die Hirnnervenkerne (Nuclei tracti solitarii und ambiguus) der dorsalen Medulla oblongata geleitet und dort inhibitorisch auf efferente sympathische Neurone verschaltet werden. Eine Aktivierung des Reflexes führt zur sofortigen Inhibierung des sympathischen Einflusses auf Myokard und glatte Gefäßmuskulatur mit einer dadurch verbundenen Reduktion von kardialer Inotropie, Herzfrequenz, Schlagvolumen und TPR, resultierend in einer Blutdrucksenkung. Dieser Regelkreis dient der Integration der beteiligten Regelgrößen beispielsweise bei körperlicher Arbeit, emotionalem Stress oder Orthostase. Ein plötzlicher Blutdruckabfall wirkt durch fehlende Afferenzen der Barorezeptoren disinhibierend auf den Sympathikus mit folgender Steigerung der Herzfrequenz, Inotropie und TPR, was wiederum ein Anstieg des Blutdrucks zur Folge hat [Persson 1996]. Die Denervierung der Pressorezeptoren bspw. iatrogen durch Operationen im Hals/Thorax Bereich führen langfristig nicht zu einer arteriellen Hypertonie, da andere Regelkreise den Blutdruck binnen weniger Tage normalisieren. Trotzdem ist die Blutdruckvariabilität erhöht [Timmers, Henri J L M, et al. 2003].

1.1.2.2. Mittelfristige Mechanismen

Kontrollmechanismen der mittelfristigen Blutdruckregulation agieren innerhalb weniger Minuten bis zu einigen Stunden.

Kapilläre Volumenverschiebung

Zwischen Kapillaren und extravasalem Raum findet ein ständiger Volumenaustausch statt. Änderungen des hydrostatischen oder kolloidosmotischen Drucks im

Kapillargebiet führen bei Anstieg zu einer erhöhten Flüssigkeitsfiltration bzw. bei Abfall zur gesteigerten Rückresorption mit Volumenverschiebungen zwischen intra- bzw. extravasalen Raum. Die konsekutive Änderung des zirkulierenden Blutvolumens ist an der Homöostase des Blutdruckes beteiligt [Guyton 1991].

Endothelabhängige Vasodilatation

Pulsatile Dehnung und Scherstress durch hohen Blutdruck führen zu einer endothelabhängigen Vasodilatation. Durch den mechanischen Stress werden endotheliale vasoaktive Substanzen sezerniert. Der wichtigste Faktor dabei ist das NO, das bei der Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) aus der Aminosäure Arginin synthetisiert wird [Busse und Fleming 1998].

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-(Aldosteron)-System (RAAS) ist einer der bedeutendsten physiologischen Regelkreise innerhalb der Blutdruckregulation. Es ist eine Kaskade verschiedener Peptidasen, Prohormone und Effektorhormone. Die Effektorhormone Angiotensin-II und Aldosteron haben u.a. Auswirkungen auf Gefäßtonus und Gefäßweite, sowie auf das Resorptionsverhalten der Nieren [Guyton 1991]. Die renal gebildete Endopeptidase Renin spaltet von dem hauptsächlich in der Leber gebildeten Peptid Angiotensinogen (452 Aminosäuren, AS) das Prohormon Angiotensin-I (10 AS) ab. Dieses wird im Verlauf der Kaskade nochmals durch die hauptsächlich am Endothel der Lunge lokalisierte Peptidase Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in Angiotensin-II (8 AS) modifiziert [Guang, et al. 2012; Mehta und Griendling 2007].



Abbildung 1-2: Schema, Angiotensin-II Bildung

Angiotensin-II ist ein Effektorhormon und wirkt über spezifische Angiotensin Rezeptoren. Die dominierenden Effekte des Ang-II erfolgen durch Aktivierung des AT₁ Rezeptors (AT₁R). Über gefäßständige AT₁R wirkt Ang-II direkt blutdruckerhöhend durch Vasokonstriktion. In der Nebenniere führt die Aktivierung zur Freisetzung des Mineralcorticoids Aldosteron, welches im Sammelrohr die Natrium-

rückresorption und Kaliumsezernierung fördert und dadurch osmotisch zu einer Volumenerhöhung führt. Zentral steigert Ang-II die Freisetzung von Antidiuretischen Hormon (ADH) aus der Hypophyse. ADH fördert an Zellen des Sammelrohrs den Einbau von Aquaporinen an der lumenseitigen Zellmembran, sodass die Wasserretention gesteigert wird. Letztlich löst Ang-II vermutlich im Zusammenspiel mit dem Hypothalamus Durstgefühl aus. Eine eher untergeordnete Rolle spielt die Wirkung des Ang-II am AT_2 Rezeptor (AT_2R). Die Effekte belaufen sich hauptsächlich auf embryonale Zelldifferenzierung. Weitere Funktionen im adulten Organismus sind bisher unklar und Gegenstand aktueller Forschung. Viele Arbeiten konnten jedoch bereits Hinweise über antagonistische Wirkungen gegenüber dem AT_1R nachweisen [Chappell 2012].

AT_1R

Vasokonstriktion

Aldosteron \uparrow

ADH \uparrow

Renale Perfusion \uparrow

Durst

AT_2R

Embryonale Zelldifferenzierung

antagonistische Wirkung zum AT_1R

Endotheliale NO Freisetzung

Tabelle 1-1: Angiotensin-II Rezeptoren [Chappell 2012]

Stimuliert wird das endokrine RAAS durch die Reninfreisetzung aus Zellen des juxtaglomerulären Apparates. Die Reninfreisetzung wird hauptsächlich durch das vegetative Nervensystem über β -adrenerge Stimulation oder durch einen Blutdruckabfall an den zum Glomerulum zuführenden Gefäß (Vas afferens) ausgelöst. Durch diese Mechanismen werden beispielsweise Volumenmangelsituationen kompensiert. Durch negative Rückkopplung hemmt Angiotensin-II die Reninfreisetzung [Guyton 1991]. Chronisch erhöhte Angiotensin-II Spiegel können pathologische Prozesse triggern. Dazu zählt die dauerhafte Blutdruckerhöhung, Hyperplasie und Hypertrophie vaskulärer glatter Muskulatur [Griendling, et al. 1994; Xi, et al. 1999; Geisterfer, et al. 1988; Berk, et al. 1989], Myokardhypertrophie und -fibröser Umbau (Remodeling), reduzierte Fibrinolyse und renale Fibrose [Fernandez-Alfonso, et al. 1992; Mehta und Griendling 2007; Crawford, et al. 1994]. Das RAAS bietet daher gute Angriffspunkte für die Behandlung der arteriellen Hypertonie und derer Folgeschäden. Neben dem klassischen RAAS sind sogenannte lokale Renin-Angiotensin-Systeme Gegenstand aktueller Forschung. In vielen Geweben konnte in den letzten Jahren Reninaktivität und die gleiche Kaskadenabfol-

ge wie im klassischen RAAS nachgewiesen werden. Der Regelkreis arbeitet dabei auf intrazellulärer und parakriner Ebene. Organe in denen ein lokales RAS identifiziert wurde sind beispielweise Herz, Gefäße, Zentrales Nervensystem, Ovarien, Adipozyten und der Verdauungstrakt. Die physiologischen Funktionen der lokalen RAS sind bislang nicht eindeutig bekannt, jedoch scheinen sie besonders an pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. myokardialer Hypertrophie und fibrösem Umbau beteiligt zu sein [Paul, et al. 2006]. In den letzten Jahren konnten weitere Achsen des RAS identifiziert werden. Neben der klassischen (ACE - Ang II - AT₁R) wurden die ACE2 - Ang-(1-7) – AT₇R und die APA - Ang IV – AT₄R Achse beschrieben [Chappell 2007; Coleman, et al. 1998]. Angiotensin-(1-7) entsteht durch die hauptsächlich an den proximalen Tubuluszellen vorkommende Endopeptidase ACE2, welche Ang-II durch Abspaltung von Phenylalanin zu Angiotensin-(1-7) prozessiert. Weiterhin wird Ang-I durch die ebenfalls in den proximalen Tubuluszellen lokalisierte Metalloproteinase Nephrylysin in Ang-(1-7) umgewandelt. Ang-(1-7) hat über den AT₇Rezeptor antagonistische Wirkungen gegenüber der klassischen ACE – Ang-II - AT₁R – Achse. Die bisherigen Beschreibungen beschränken sich dabei auf die renale Funktion. So bewirkt die Infusion von Ang-(1-7) in Kaninchen eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und die Dilatation von vorher konstringierten Arteriolen. Die Rolle des Angiotensin IV wird derzeit kontrovers diskutiert. Erste Studien zeigen, dass Ang-IV zu einer Erhöhung des kortikalen Blutflusses in der Niere beiträgt. Weiterhin zeigt es ähnliche Wirkungen wie Angiotensin-II. Angiotensin-IV entsteht u.a. durch Abspaltung von Asparagin von Ang-II katalysiert durch die in den Nieren vorkommende Aminopeptidase A (APA).

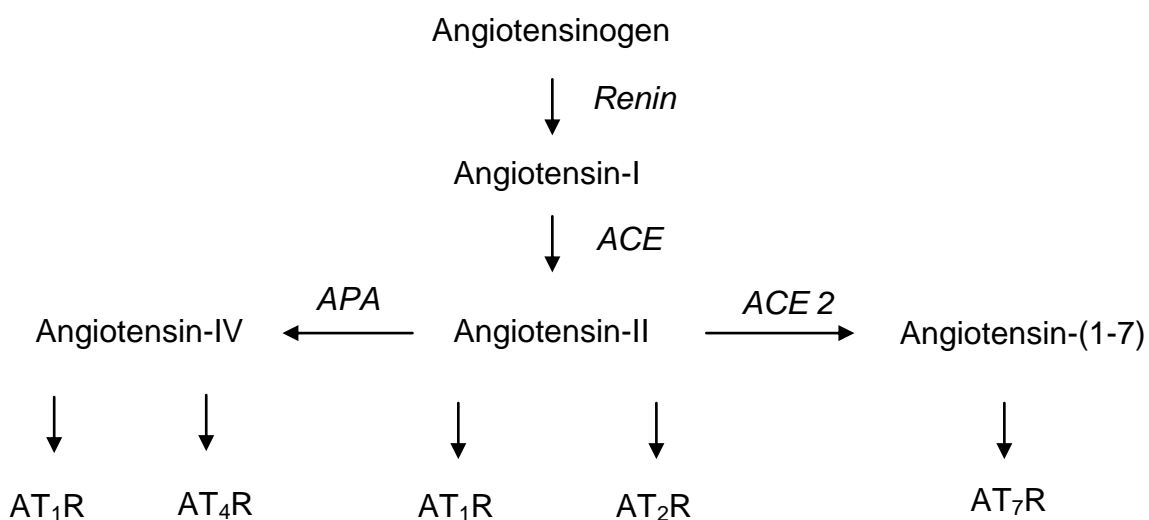


Abbildung 1-3: Schema, Erweitertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Aldosteron, Antidiuretisches Hormon (ADH) und Atriales natriuretisches Peptid (ANP)

Aldosteron, ADH und ANP sind Hormone, die im Wesentlichen über Veränderungen von Plasmanatrium und -osmolalität und damit zusammenhängenden Volumenveränderungen in die Blutdruckregulation eingreifen. Für diese Arbeit spielt v.a. Aldosteron eine Rolle. Aldosteron ist ein blutdrucksteigerndes Mineralcorticoid und wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde aus steroidal Vorstufen synthetisiert (siehe Abbildung 1-4) und endokrin sezerniert.

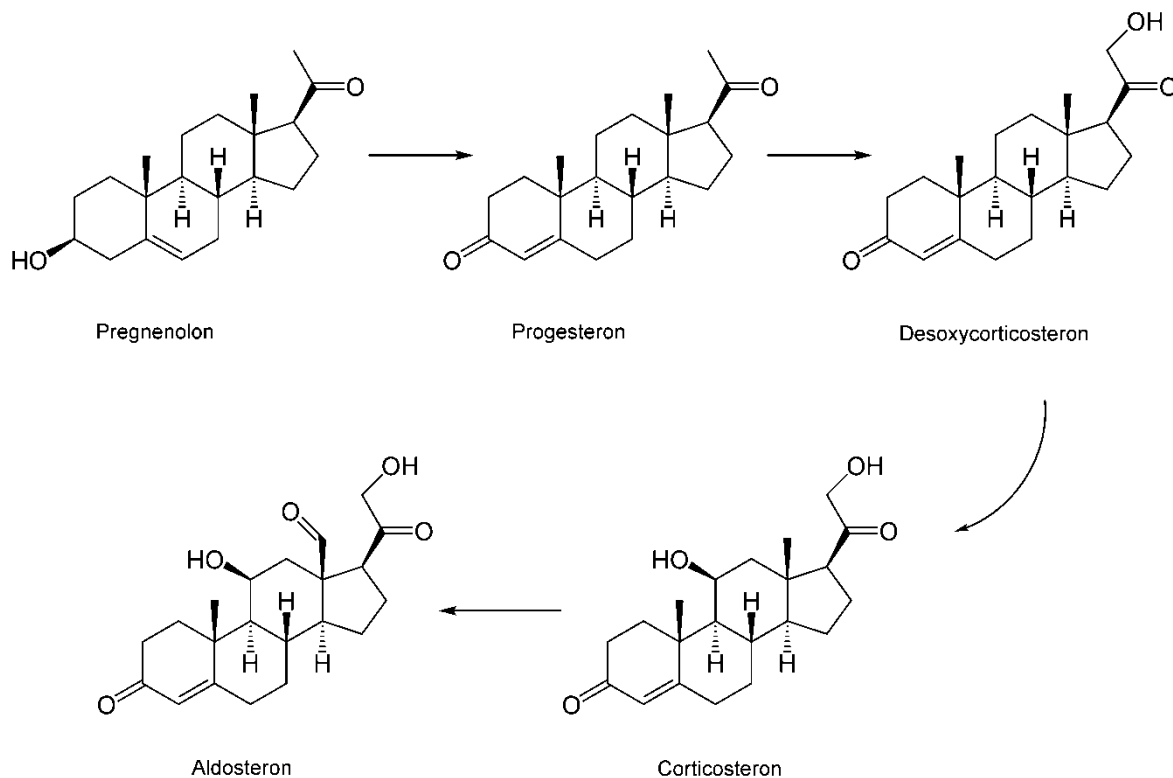


Abbildung 1-4: Schema, Aldosteronsynthese

Die vermehrte Bildung und endokrine Freisetzung von Aldosteron erfolgt durch die Bindung von Angiotensin-II an die AT_1 Rezeptoren der Aldosteron-sezernierenden Zellen, sowie getriggert durch einen erhöhten Kaliumspiegel im Blut [Slater 1969]. Aldosteron aktiviert den intrazellulär gelegenen Mineralcorticoidrezeptor (MR), welcher besonders in epithelialen Zellen der Nieren und des Kolons enthalten ist [Fiebeler, et al. 2007; Fuller und Young 2005]. In der Niere führt dessen Aktivierung zu einem verstärkten Einbau epithelialer Natrium-Ionenkanäle (E_{NaC}) in die harnseitige Zellmembran von Hauptzellen des Sammelrohres und damit verbunden zu einer gesteigerten Natriumrückresorption in das Blutplasma [Chen, et al. 1999]. Die Erhöhung des Plasmanatriums führt aufgrund der osmotischen Wirkung

zu einer Volumenexpansion mit konsekutiver Blutdruckerhöhung. Einen antagonistischen Effekt bewirkt das in rechtsatrialen Myozyten synthetisierte atriale natriuretische Peptid. Die endokrine Freisetzung erfolgt aufgrund einer Volumenbelastung des rechten Vorhofes. Die Wirkung des Hormons ist eine verstärkte renale Natriumausscheidung sowie eine Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems durch eine Hemmung der Reninfreisetzung am juxtaglomerulären Apparat [de Bold, A J, et al. 2001; Kuhn 2012].

Die Plasmaosmolalität und damit verbundene Blutdruckänderungen werden besonders durch das in der Hypophyse freigesetzte Peptidhormon ADH gesteuert. Die Wirkung des ADHs erfolgt u.a. über dessen V_1 -Rezeptor, lokalisiert in Zellen des Sammelrohres. Die Aktivierung führt zu einem vermehrten Einbau von Aquaporinen Typ-2 (AQP2) in die harnseitige Zellmembran des Sammelrohrepithels [Knepper und Nielsen 2004], sodass freies Wasser vermehrt aus dem Primärharn resorbiert und dadurch die Plasmaosmolalität verringert wird. Da es dadurch zu einer Volumenexpansion kommt, steigt auch der arterielle Blutdruck aufgrund des Frank-Starling-Gesetzes. Die Ausschüttung des ADHs wird durch Osmorezeptoren im Hypothalamus gesteuert. Dehnungsrezeptoren im rechten Vorhof vermitteln über den Gauer-Henry-Reflex eine Hemmung der ADH Sekretion [HENRY, et al. 1956; Nielsen, et al. 1995].

1.1.2.3. Langfristige Mechanismen

Kontrollmechanismen der langfristigen Blutdruckregulation agieren innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen. Die genauen Mechanismen sind bis heute nicht eindeutig erklärt. Die wichtigste Rolle spielen dabei vermutlich langsam einsetzende, druckinduzierte Änderungen der Natrium und Flüssigkeitsbilanz, sowie zentralnervöse Faktoren [Guyton 1991; Dampney, R A L, et al. 2005].

Flüssigkeitshaushalt & Druckdiurese

Bei unphysiologisch und potentiell schädlich erhöhtem Blutdruck scheiden die Nieren vermehrt Na^+ und Flüssigkeit aus. Die daraus folgende Reduktion des Plasmavolumens führt zu einer Erniedrigung der Vorlast und nach dem Frank-Starling-Gesetz zu einer geringeren Auswurfleistung des Herzens mit konsekutiver Blutdrucksenkung. Eine unphysiologische Erniedrigung des Blutdrucks führt zum gegenteiligen Effekt der vermehrten Salz- und Flüssigkeitsretention in der Niere mit kausalem Blutdruckanstieg [Guyton 1991]. Eine wichtige Rolle spielt dabei vermutlich die Druckdiurese. Die marknahen renalen Blutgefäße unterliegen im Gegen-

satz zu rindenständigen Blutgefäßen nur einer geringen Autoregulation. Bei erhöhtem mittleren arteriellen Druck (etwa >90mmHg) kommt es dadurch im Bereich des Nierenmarks zu einer verminderten Natrium- und Wasserretention aus dem Primärharn. Dieser Mechanismus unterliegt vermutlich einem erhöhten interstitiellen Druck im Nierenmark, sodass die parazelluläre Natriumreabsorption inhibiert ist und vermehrt Flüssigkeit über den Harn ausgeschieden wird. Die genauen Mechanismen sind Gegenstand aktueller Forschung und werden auch besonders im Zusammenhang mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie diskutiert [Evans, et al. 2005; Beard und Mescam 2012].

1.2. Entzündliche Genese der arteriellen Hypertonie

Eine Reihe früherer Arbeiten konnte kausale Zusammenhänge zwischen dem Immunsystem, dem Faktor „Entzündung“ und der arteriellen Hypertonie identifizieren [Guzik, et al. 2007; Harrison, et al. 2011; Marvar, et al. 2010; Wu, et al. 2014]. Das Zusammenspiel aller an der Immunantwort beteiligten Zellen gilt als sehr komplex und ist bis heute nicht endgültig aufgeklärt. Auch autoimmunologische Prozesse, bei denen das Immunsystem körpereigene Strukturen angreift sind möglich [Maggadottir und Sullivan 2014]. So können z.B. autoimmunologisch vermittelte Vaskulitiden eine arterielle Hypertonie bereits bei Jugendlichen bedingen [Sadurska, et al. 2012].

1.2.3. Das Immunsystem

Das Immunsystem wehrt primär in den Organismus eindringende Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten ab. Es wird hierbei zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem unterschieden [Medzhitov und Janeway 1997].

1.2.3.3. Angeborenes Immunsystem

Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen), Monozyten (nach Einwanderung in extravaskuläre Gewebe: Makrophagen), Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) und Epithelzellen. Lösliche Faktoren sind u.a. Lysozym, Defensine und das Komplementsystem [Aderem und Underhill 1999; Ganz 2002]. Die von den Zellen erkannten Pathogene werden durch antimikrobielle Substanzen, vor allem reaktive Sauerstoffspezies, bekämpft und phagozytiert. In den meisten Fällen wird bereits vom angeborenen Immunsystem die Ausbreitung einer Infektion verhindert. Sezernierte

inflammatorische Mediatoren und Interleukine, sowie die Präsentation aufgenommener Antigene auf MHC-II Rezeptoren steuern jedoch weiterhin die Aktivierung der adaptiven Immunantwort [Koyama, et al. 2008; Takeuchi und Akira 2009].

1.2.3.4. Adaptives Immunsystem

Das phylogenetisch jüngere adaptive Immunsystem ist nur bei höheren Vertebraten zu finden. Die Zellen der adaptiven Immunantwort entwickeln sich aus lymphatischen Vorläuferzellen und werden nach dem Ort ihrer finalen Reifung als B-Lymphozyten (Knochenmark, englisch: bone marrow) und T-Lymphozyten (Thymus) benannt. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt hochspezifisch durch die Zellen des adaptiven Immunsystems. Jeder gereifte T- bzw. B-Lymphozyt besitzt einen individuellen Rezeptor zur Erkennung eines bestimmten Antigens. Bei einer Antigenerkennung kommt es zur klonalen Expansion der aktivierten Zelle. Die eigentliche Immunabwehr durch das adaptive Immunsystem erfolgt durch die Bildung hochspezifischer Antikörper gegen das jeweils erkannte Pathogen. Antigenpräsentierende Zellen (u.a. Makrophagen und dendritische Zellen) bilden dabei mit T- und B-Lymphozyten ein hochkomplexes Zusammenspiel. Die Zellen des Immunsystems kommunizieren sowohl über direkten Zellkontakt durch oberflächliche Rezeptoren und Cofaktoren, sowie parakrin über sezernierte Interleukine. Aus B-Zellen gereifte Plasmazellen sezernieren schließlich die immunologisch wirksamen spezifischen Antikörper, welche Pathogene durch Opsonierung unschädlich machen und für das Phagozytosesystem sowie zytotoxische T-Lymphozyten angreifbar werden. Weiterhin rufen T-Lymphozyten in infizierten Zellen den programmierten Zelltod aus und aktivieren Makrophagen [Boehm 2011].

1.2.3.5. Spezifische Oberflächenmarker

Alle Leukozyten zeichnen sich durch ein spezifisches Muster der Oberflächenantigene (Cluster of Differentiation, CD) aus. Zurzeit sind weit über 200 CD-Antigene bekannt. Folgende Tabelle zeigt die für diese Arbeit relevanten:

CD-Antigen	Funktion	Spezifischer Zelltyp
CD3	Cofaktor des T-Lymphozyten-Rezeptors	T-Lymphozyten
CD4	Corezeptor für MHC-II-Moleküle	T _H 1 und T _H 2 Zellen, Monozyten, Makrophagen
CD8	Corezeptor für MHC-I-Moleküle	Zytotoxische T-Lymphozyten
CD19	Corezeptor für B-Lymphozyten	B-Lymphozyten
CD45	Tyrosinphosphatase	Nahezu alle hämatopoetischen Zellen, außer Erythrozyten

Tabelle 1-2: Cluster of Differentiation

1.2.3.6. Subtypen der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich weiter in mehrere Subtypen unterteilen.

Subtyp	CD8+ zytotoxischer T-Lymphozyt	CD4+ T-Helferzelle 1 (T _H 1)	CD4+ T-Helferzelle 2 (T _H 2)	CD4+ T-Helferzelle 17 (T _H 17)	CD4+ Regulatorischer T-Lymphozyt (T _{Reg})
Hauptfunktion in der Immunabwehr	Tötung virusinfizierter Zellen	Makrophagenaktivierung, Aktivierung von B-Lymphozyten	Aktivierung von B-Lymphozyten	Neutrophilenverstärkung	Unterdrückung von T-Lymphozyten Reaktionen

Tabelle 1-3: Wichtige T-Lymphozyten Subtypen

Die verschiedenen Subtypen der T-Lymphozyten erfüllen in der adaptiven Immunantwort unterschiedliche Aufgaben. CD4+ T-Lymphozyten erfassen auf MHC-II Molekülen den membranständigen „Antigentträgerproteinen“ der phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems, präsentierte Antigene. CD8+ T-Lymphozyten erfassen solche, die auf MHC-I Molekülen lokalisiert sind. MHC-I wird von nahezu allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert [Calabi und Milstein 1986; Neefjes, et al. 2011]. In früheren Arbeiten zur entzündlichen Genese der arteriellen Hypertonie werden auch den einzelnen T-Lymphozyten-Subtypen verschiedene pathophysiologische Wirkungen zugesprochen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass von T_H17 Lymphozyten sezerniertes Interleukin-17 eine Ang-II induzierte arterielle Hypertonie verstärkt [Madhur, et al. 2010]. Regulatorische CD4+ T-Lymphozyten hingegen reduzieren eine Ang-II bedingte arterielle Hypertonie und schützen vor vaskulären Schäden [Barhoumi, et al. 2011].

1.2.3.7. Reaktive Sauerstoffspezies & Angiotensin-II

Einige Formen arterieller Hypertonie zeigen einen Zusammenhang mit vaskulär hoch konzentrierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [Majzunova, et al. 2013]. Neben der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase [Dikalov und Ungvari 2013], Xanthin-Oxidase, Lipoxygenase und Myeloperoxidase wurde die membrangebundene NAD(P)H-Oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) im der glatten Muskulatur als größte Quelle von ROS in vaskulärem und kardialem Gewebe identifiziert [Griendling, et al. 1994; Sugamura und Keaney 2011; Welch 2008; Cifuentes, et al. 2000; Griendling, et al. 2000].

Das Enzym katalysiert die 1-Elektron-Reduktion eines Sauerstoffmoleküls mit nachfolgender Entstehung eines Superoxidmoleküls ($O_2^{\cdot -}$):



Neben anderen Faktoren führen besonders Angiotensin-II [Cifuentes, et al. 2000; Rajagopalan, et al. 1996; Griendling, et al. 1994] und Desoxycorticosteronacetat (DOCA), jedoch nicht Katecholamine zur Stimulierung vaskulärer NAD(P)H Oxidase [Laursen, et al. 1997]. Die Wirkung der ROS wurde in den letzten Jahrzehnten genau beleuchtet. ROS erfüllen physiologische Aufgaben im Sinne eines second messengers. Sie sind notwendig zum Wachstum und Überleben glatter Muskelzellen [Nishio und Watanabe 1997; Tsai, et al. 1996; Irani 2000] und stellen den Gegenspieler für vasodilatativ wirkendes Stickstoffmonoxid dar [Mügge, et al. 1991]. Bei hohen Gewebekonzentrationen sind sie aber auch in pathophysiologische Zusammenhänge involviert. Die genaue Spezies der ROS, Antioxidantien und deren lokale Konzentrationen scheinen in gesunden Gefäßsystemen in einem komplexen Gleichgewicht zu liegen. Missverhältnisse können zu Atherosklerose und Hypertonie führen. Freie Sauerstoffradikale erhöhen den vaskulären oxidativen Stress, wirken positiv auf Zellwachstum [Rao und Berk 1992] und die unphysiologische Inaktivierung von NO [Mügge, et al. 1991]. Dass ROS in vivo Effekte auf den Blutdruck haben beschreibt z.B. eine Studie von Landmesser et. al.. Er beobachtete bei Mäusen, denen das Gen für p47(phox), einer Untereinheit der vaskulären NADPH Oxidase, deletiert wurde, eine schwächer ausgeprägte Angiotensin-II induzierte Hypertonie in den KO-Mäusen gegenüber Wildtypen [Landmesser, et al. 2002]. Desweiteren legen Liu et al. dar, dass die kompetitive Inhibierung der NADPH-Oxidase durch Infusion des Polypeptids (gp91ds)-tat, einem intra- und

extrazellulär wirkenden Inhibitor der NADPH-Oxidase während einer gleichzeitig durchgeführten Ang-II Infusion in Ratten, zu einer weniger ausgeprägten arteriellen Hypertonie und Mediahypertrophie führt als bei der Kontrollgruppe ohne Inhibition der NADPH-Oxidase [Liu, et al. 2003].

1.2.4. Adaptives Immunsystem & Hypertonie

Neben den vaskulären Geweben und den Zellen der angeborenen Immunabwehr, exprimieren auch T-Lymphozyten eine funktionelle NADPH-Oxidase, die der in neutrophilen Granulozyten ähnelt [Jackson, et al. 2004].

Weiterhin besitzen T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche AT1-Rezeptoren, welche nach Aktivierung durch Angiotensin-II über eine Calcineurin abhängige Signalkaskade proliferativ und aktivierend auf T-Zellen wirken [Nataraj, et al. 1999; Lu, et al. 1996]. Experimente von Guzik et al. ergaben, dass Rag-1^{-/-} Mäuse, deren Immunsystem über keine reifen B- und T-Lymphozyten verfügt, eine gegenüber Wildtypen milder ausgeprägte Hypertonie und geringere vaskuläre ROS-Level unter Angiotensin-II Infusion zeigen. Nach T-Lymphozyten Transplantation in die Knockoutmäuse zeigten diese dann wieder einen vergleichbaren Blutdruckanstieg und ähnlich hohe ROS-Level im Gefäßsystem wie Wildtypen. Seine Ergebnisse implizieren, dass in das periadventitielle Fett eingewanderte T-Lymphozyten die ROS Bildung durch deren NADPH Oxidase verstärken und die volle Ausprägung einer arteriellen Hypertonie ermöglichen [Guzik, et al. 2007]. Wu et. al konnten im Experiment weiterhin zeigen, dass die Anwesenheit von T-Lymphozyten zu einer maximalen Ausprägung einer vaskulären Fibrosierung bei Ang-II induzierter Hypertonie erforderlich ist [Wu, et al. 2014].

1.3. Zielsetzung

Diese Arbeit soll die Hämodynamik von Rag-1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen bei Ang-II induzierter Hypertonie genau untersuchen und bedient sich der telemetrischen Blutdruckmessung. Die Hypothese lautet, dass T-Lymphozyten eine arterielle Hypertonie bei Ang-II Infusion im 14-tägigen Frühstadium verstärken. Der Blutdruck wird dabei über 14 Tage rund um die Uhr an der wachen Maus invasiv radiotelemetrisch erfasst. Ein weiterer Fokus wird neben dem Blutdruckverhalten auf funktionelle und morphologische Schäden an kardiovaskulär beteiligten Organen gelegt. Dabei sollen mögliche direkte Zusammenhänge zwischen Organschäden und Hypertonie mit und ohne T-Lymphozytären Einfluss eruiert werden.

2. Material & Methodik

2.1. Tierversuch

Hypothese und Fragestellungen wurden in dieser Doktorarbeit in einem Mausmodell überprüft. Der Tierversuch wurde nach § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) bei der Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz – Veterinärwesen/Lebensmittelsicherheit, Billstraße 80, 20539 Hamburg beantragt und am 16.03.2011 für eine Dauer von 3 Jahren genehmigt. Antragsnummer: 14/11. Verantwortlicher Leiter des Tierversuches ist Prof. Dr. med. Heimo Ehmke (Direktor des Institutes für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf). Stellvertretende Leiterin und exekutive Wissenschaftlerin ist Dr. med. Anika Seniuk (Wissenschaftlerin im Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf). Für mich lag eine Genehmigung von oben genannter Behörde für Pflege und Versorgung der Tiere, sowie Organentnahmen an den toten Tieren vor.

2.1.1. Verwendete Mauslinien

Zum Einsatz kamen zwei international bereits etablierte Mauslinien:

2.1.1.1. Rag1tm1Mom (Rag-1^{-/-})

Diese Knockout-Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen des Rekombination-activating Gene-1 (Rag-1) aus. Rag-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der T- und B-Lymphozyten: Durch das Ausbleiben der V(D)J Rekombination, einer somatischen Rekombination u.a. von B- und T-Zell-Rezeptor-Genen, besitzen diese Tiere auf Ihren Zellen keine vielfältigen und funktionsfähigen B- bzw. T-Zell-Rezeptoren. [Mombaerts, et al. 1992] Es handelt sich also um einen schweren Defekt des adaptiven Immunsystems. Die Haltung dieser Mäuse erfordert eine möglichst sterile Umgebung, da sie besonders für virale Krankheitserreger empfänglich sind [Koyama, et al. 2008; Takeuchi und Akira 2009]. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie ist die C57BL/6J Linie [The Jackson Laboratory. 10.05.2015]. Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse sind männliche Wurfgeschwister von direkten Nachkommen von „The Jackson Laboratory (USA)“ importierten Zuchttieren. Die Zucht fand unter sterilen Bedingungen in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf statt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere 12-16 Wochen alt.

2.1.1.2. C57BL/6J

Die C57BL/6 Maus ist die weltweit für Forschungszwecke am meisten genutzte inzüchtige Mauslinie [The Jackson Laboratory. 10.05.2015]. Die in dieser Arbeit genutzten männlichen Mäuse wurden von Charles River Laboratories International, Inc., Sulzfeld, Deutschland (Hauptsitz: Wilmington, USA) erworben. Genetisch entstammen sie von „The Jackson Laboratory, USA“. Dadurch erhalten sie ein „J“ als Namenszusatz.

2.1.2. Haltung

Die Tiere lebten stets in Einzelhaltung. Jede Maus befand sich in einem 365mm x 207mm x 140mm großen Käfig aus Plexiglas (Modell: 1284L Eurostandard Typ II L, TECNIPLAST, Deutschland). Neben einem Gitter¹ mit Futterraufe und eine 450ml Trinkflasche¹ wurde jeder Käfig mit einem speziellen Filterdeckel¹ abgedeckt, der laut Hersteller einen nachgewiesenen mikrobiologischen Schutz bietet [TECNIPLAST Juli 2007]. In dem Käfig selbst befand sich eine etwa 1-2cm hohe Lage weicher, staubfreier Sägespäne, ein spezielles Maus-Häuschen¹ und steriler Zellstoff als Nestbaumaterial. Die Käfige sowie sämtliches Zubehör wurden vor Benutzung autoklaviert und bis zur Benutzung steril verpackt. Aufgrund des Immundefektes der Rag-1^{-/-}-Linie befanden sich die individuell mit Filterdeckel versehenen Käfige aller Versuchstiere in einem speziellen Maushaltungsschrank². Eine Luftzufuhr erfolgt in diesem Schrank nur keimfrei gefiltert über eine an der Schrankdecke befindliche, elektrische Ventilationseinheit. Durch eine Öffnung am Boden des Schrankes kann die Luft wieder austreten, sodass sich ein ständiger keimarmer Luftstrom durch den gesamten Haltungsschrank ergibt. Durch diese Maßnahme sollte die Umgebung der Mäuse möglichst pathogenarm gehalten werden. Während der telemetrischen Blutdruckmessung befand sich jeder Käfig im Schrank auf einer speziellen Empfängerplatte, welche das Signal des Telemetriesenders empfangen und auf den Computer übertragen kann (siehe 3.3). Um jeden einzelnen Käfig herum waren Metallkonstruktionen angebracht, welche als partielle elektromagnetische Abschirmung fungierten, damit zwischen einzelnen Telemetriesendern keine Interferenzen auftreten können. Der Haltungsschrank steht in einem abgeschlossenen für die Maushaltung zertifizierten fensterlosen Raum, in dem die hauseigene Klimaanlage und ein Luftbefeuchter³ für ein kon-

¹ TECNIPLAST, Deutschland

² Scantainer, Scanbur-Bk, Dänemark

³ Hygromatik, Deutschland

stantes Raumklima (Temperatur 20-24°C; Relative Luftfeuchte: 45-65%) sorgen. Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden von einem Thermo- bzw. Hygrometer⁴ dauerhaft aufgezeichnet und kontrolliert. Eine Deckenlampe, deren Glühbirne⁵ tageslichtähnliches Licht emittierte, sorgte für die adäquate Beleuchtung. Die Schaltung folgt dem gängigen Tag-/Nacht Rhythmus (Hellphase: 07:00 – 19:00).

2.1.3. Ernährung

Aufgrund des Immundefektes der Rag-1^{-/-}-Linie erhielten alle Tiere durch Gammastrahlung sterilisiertes LASQCdiet® Rod16-R Mausfutter⁶. Das Futter hat einen Energiegehalt von 15,9 MJ/kg und enthält als Hauptnährstoffe: 16,9% Protein, 4,3% Fett, 4,3% Faser, 7,0% Asche; angegebene Elektrolyte: Calcium 10,0 g/kg, Natrium 3,0 g/kg Magnesium 2,5 g/kg; die Inhaltsstoffe in absteigender Reihenfolge: Weizen, Weizenkleie, Gelbmaiskleber, Hafer, Weizenmehl, Mais, Gerste, Leinöl, Calciumcarbonat, Zuckerrübenmelasse, Bierhefe, Mineralstoffe, Vitamin-/ Spurenelement- Mischung [LAS VENDI 2010]. Das Futter befand sich in der integrierten Futterraufe des Abdeckgitters und war der Maus jederzeit ad libitum zugänglich. Autoklaviertes Leitungswasser stand ebenfalls in Trinkflaschen ad libitum bereit.

2.1.4. Mausvisite

Mindestens 1x täglich wurde bei jeder Maus eine Visite durchgeführt. Es erfolgten augenscheinliche Kontrollen des Gesundheits-, Pflege-, Verhaltens- und Ernährungszustandes. Das Körpergewicht wurde mindestens 1x wöchentlich protokolliert.

2.2. Ablauf des Experiments

Hypothese und Fragestellungen wurden nach einem vorher exakt definierten Versuchsprotokoll überprüft.

2.2.1. Schema und Endpunkte

Beide Mauslinien bildeten im Experiment jeweils eine Versuchsgruppe. Pro Gruppe wurde das Experiment mit n=8 Mäusen durchgeführt. Beide Gruppen wurden von Anfang bis Ende des Experimentes mit gleichen Methoden und Haltungsbedingungen behandelt. Weiterhin wurden von jedem Genotypen 6 Tiere ohne jegli-

⁴ RH520 Extech, USA

⁵ PL-C 4P 18W, Philips, Deutschland

⁶ LAS Vendi

che Behandlung als Kontrollgruppe für die späteren Organentnahmen unter den gleichen Bedingungen gehalten.

Versuchsprotokoll in der Übersicht:

- (1) PCR zur Verifizierung des Genotyps
- (2) Implantation eines Telemetriesenders
- (3) Mindestens 10-tägige Rekonvaleszenz
- (4) Zwei Tage telemetrische Basismessung
- (5) Subkutane Implantation einer osmotischen Minipumpe
- (6) 14-tägige telemetrische Messung unter Angiotensin-II Infusion
- (7) Organentnahme, erneute PCR & FACS zur Genotypverifizierung

2.3. Genotypisierung

Zur Sicherstellung des richtigen Genotyps wurden die Mäuse vor und nach dem Experiment hinsichtlich des Rag1^{tm1Mom} – Allels genotypisiert. Mögliche Verwechslungen sollten so ausgeschlossen werden. Es wurde eine klassische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Diese PCR und Agarosegelelektrophorese wurde durch Frau Telse Kock, MTA in unserem Institut durchgeführt.

2.3.1. Probengewinnung

Zunächst wurde Genmaterial aus einer Ohr- bzw. Schwanzbiopsie gewonnen. Dazu wurde das Gewebe in DirectPCR®-Tail⁷ ca. 17h lysiert. Enthaltene Proteinase-K baut enthaltene Proteine ab und setzt Nukleinsäuren frei. Eine anschließende essentielle Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch 45-minütige Inkubation bei 85°C.

2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. In diesem Fall sollten hochspezifische DNA-Abschnitte des Rag1^{tm1Mom} Allels vervielfältigt werden.

Eingesetzte Substanzen:

- Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase)
- Hochspezifische Primasen

⁷ Peqlab, Deutschland

- Dinukleotidtriphosphate
- PCR Puffer II, MgCl₂
- Bromphenolblau (Zur Färbung der DNA)

Primase	Sequenz	Primase Typ
oIME1746	5' GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG 3'	Wildtyp vorwärts
oIMR3104	5' CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT 3'	Wildtyp / Mutant
oIMR8162	5' TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG 3'	Mutant rückwärts

Tabelle 2-1: Eingesetzte Primasen

Die Mutanten- und Wildtypspezifischen Primasen dienen als Startpunkt bzw. Endpunkt für den der jeweiligen Maus spezifischen Genabschnitt. Als Start- bzw. Endpunkt des komplementären DNA-Stranges dient in beiden Fällen die gleiche Primase. Die Bindung (Hybridisierung) der Primasen an die DNA findet optimal bei einer Temperatur von 58° C statt. Die eigentliche Vervielfältigung der eingegrenzten DNA-Abschnitte vollzieht eine taq-DNA Polymerase in 35 Zyklen bei unterschiedlichen Temperaturen, welche maschinell vollautomatisch eingestellt werden. Die Phasen mit hoher Temperatur (94°C) dienen der Denaturierung (Aufteilung der komplementären DNA-Stränge), damit Primasen und Polymerasen in der folgenden Phase (72°) am einzelnen Strang arbeiten können. Substrate der Polymerase sind die im Überfluss vorhandenen Dinukleotidtriphosphate [Rassow 2008].

Temperatur	Dauer
94°C	180s
94°C	30s
58°C	45s
72°C	45s
72°C	180s

} 35 Zyklen

Tabelle 2-2: PCR-Temperatur-Zyklen

Während der PCR entstehen erwartungsgemäß je nach Genotyp unterschiedlich lange DNA-Stränge [The Jackson Laboratory. 10.05.2015]:

Genotyp	Länge des amplifizierten Genabschnitts
Wildtyp homozygot	474bp
Mutant heterozygot (Wildtyp + Mutant)	474bp und 530bp
Mutant homozygot	530bp

Tabelle 2-3: Erwartete Länge der amplifizierten Genabschnitte

2.3.3. Agarosegelelektrophorese

Zum Größenvergleich wurden die amplifizierte DNA-Abschnitte in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Mit einem Standard Vergleich des Mauszüchters⁸ konnte so der Genotyp der jeweiligen Maus zugeordnet werden. Die Trennung und Analyse der DNA-Fragmente wurde in 1,2%igen horizontalen Agaroseflachbett-Gelen durchgeführt. Gefärbt wurde die DNA mit 6 µL/100 ml Ethidiumbromid⁹. Die Trennung erfolgte innerhalb von 45 min bei einer konstanten Spannung von 110 V. Nach der Trennung wurde die angefärbte DNA mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera fotografiert. Die Laufgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. In der Elektrophorese entstehen so unterschiedlich weit gelaufene DNA-Banden. Anhand des Fotos wurde die Laufweite der Banden mit Standardbanden verglichen. Als Positiv-Kontrolle diente ein bekannter Abschnitt des Rag1^{tm1Mom} Allels [Rassow 2008].

2.4. Radiotelemetrische Blutdruckmessung

Um möglichst verlässliche Aussagen über die hämodynamischen Zustände der Versuchstiere treffen zu können wurden invasive Blutdruckmessungen an der wachen Maus durchgeführt.

2.4.1. Messparameter

Die Parameter Herzfrequenz (HF), systolischer (P_{Sys}) – und diastolischer Blutdruck (P_{Dst}), mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Blutdruckamplitude (pulse pressure) sowie das Maximum der Druckveränderung pro Zeit während der Systole ($\Delta P/\Delta t$) wurden intraaortal gemessen. Als letzter Parameter wurde die motorische Aktivität bestimmt (s.u.). Die Maus befand sich während der gesamten Messung ungestört in Einzelhaltung im eigenen Käfig.

2.4.2. Messinstrument

Als Messinstrument kamen implantierbare PhysioTel® PA Transmitter der Firma Data Sciences International (USA) zum Einsatz. Das verwendete Modell PA-C10 besteht aus einer Sendeeinheit mit Batterie und einem daran befindlichen Messkatheter.

⁸ Jackson Laboratory, USA

⁹ Sigma Aldrich, USA

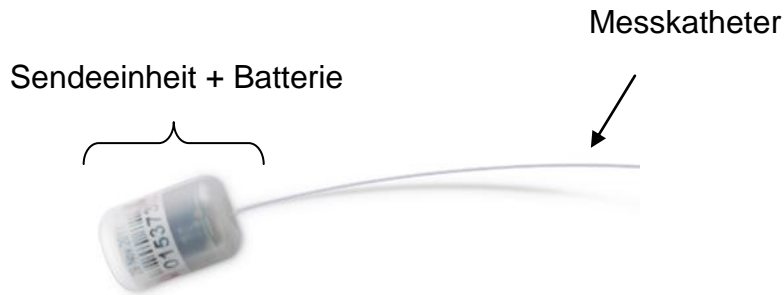


Abbildung 2-1: Telemetrieinheit, PhysioTel® PA-C10, Copyright: DSI

Sender-Kenndaten

Modell	Gewicht (g)	Volumen (cm ³)	Minimales Tiergewicht	Lebensdauer der Batterie (Wochen)
PA-C10	1,4	1,1	17 g (s.c. Implan- tation)	6

Tabelle 2-4: Sender-Kenndaten [DSI]

Der Sender wird vollständig in die Maus implantiert und dann von extern durch einen Magneten über eine Magnet-Relais-Schaltung ein- oder ausgeschaltet. Die Messdaten werden per Funkübertragung von der unter dem Käfig befindlichen Empfängerplatte¹⁰ empfangen und auf den Computer¹¹ übertragen.

2.4.3. Computerprogramm

Das Programm zur Erfassung der Daten stammt wie der Telemetriesender von der Firma Data Sciences International (USA): Dataquest A.R.T™ Gold Acquisition 4.31.

¹⁰ PhysioTel® Receivers – RPC-1 for Mice and Small Animals, DSI, USA

¹¹ Optiplex GX270, Dell, USA

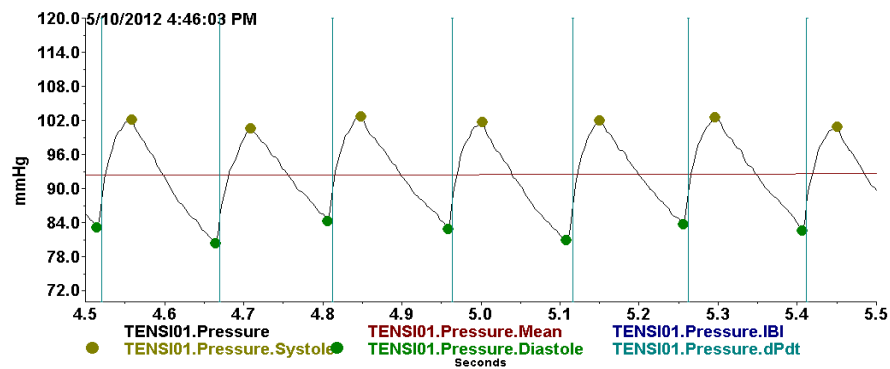


Abbildung 2-2: Druckpuls einer C57BL/6J Maus während Basismessung. Aufgezeichnet mit Dataquest A.R.T.TM Gold Acquisition 4.31

Das Programm berechnet im arteriellen Druckpuls über das lokale Maximum in einem Herzzyklus den systolischen Druck (Abb. 2: TENSIO1.Pressure.Systole) und über das lokale Minimum den diastolischen Druck (Abb.2: TENSIO4.Pressure.DiaStole). Weiterhin wird der mittlere arterielle Druck über das Druckpulsintegral errechnet (Abb.2:TENSIO4.Pressure.Mean). $\Delta P/\Delta t_{\max}$, der maximale Druckanstieg pro Zeit, trennt die Herzzyklen voneinander (Abb.2: TENSIO4.Pressure.IBI). Gleichzeitig kann das maximale $\Delta P/\Delta t$ für weitere Analysen verwendet werden. Die Herzfrequenz ergibt sich aus der Anzahl der Herzzyklen pro Minute. Da die Qualität der Druckmessung auch dem sich verändernden Umgebungsdruck unterliegt, wird dieser von einem elektronischen Barometer¹² gemessen und durch Gold Acquisition 4.31 eine automatische Korrektur des Nullpunktes vorgenommen. Weiterhin konnte die motorische Aktivität über relative Bewegungen der Maus gegenüber der Empfängerplatte bestimmt werden. Die Aktivität wird dabei in „Bewegungsregistrierungen“ / Minute angegeben.

2.4.4. Messintervalle

Alle in dieser Arbeit verwendeten Messungen wurden in einem bestimmten zeitlichen Rhythmus durchgeführt. Während der gesamten Zeit der Basismessung und der Zeit der Ang-II Behandlung erfolgte alle fünf Minuten eine ein-minütige kontinuierliche Messung. Jeder Parameter wurde über eine Minute gemittelt und protokolliert.

¹² DSI APR-1 (Ambient Pressure Reference), DSI, USA

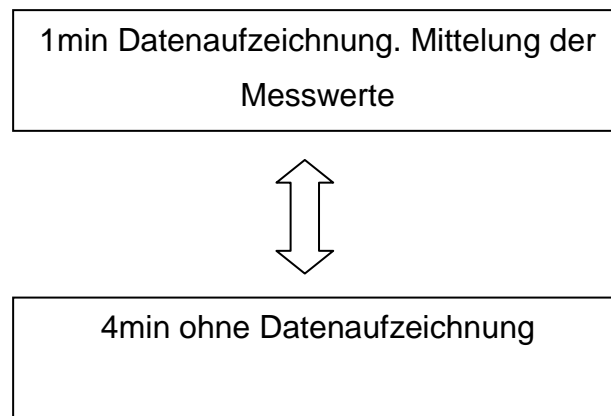


Abbildung 2-3: Schema, Datenaufzeichnungsplan

Time Stamp	TENSI01.Activity	TENSI01.Diastolic	TENSI01.Heart Rate	TENSI01.Pressure	TENSI01.Systolic
10.05.2012 19:00	6,4	101,275	690,503	111,2	120,213
10.05.2012 19:05	35,6	105,691	652,823	117,367	127,173
10.05.2012 19:10	9,4	97,388	601,571	108,868	119,11
10.05.2012 19:15	17	105,447	670,539	118,362	129,065
10.05.2012 19:20	33,8	112,404	664,101	124,683	135,633
10.05.2012 19:25	18,4	109,191	650,084	120,431	130,372
10.05.2012 19:30	20	117,233	635,24	129,357	140,6

Tabelle 2-5: Ausgabe der Rohdaten aus Gold Acquisition 4.31 in eine MS Excel¹³ Tabelle

Die durch Gold Acquisition 4.31 protokollierten Rohdaten wurden in eine MS Excel¹³-Tabelle exportiert, bearbeitet, grafisch aufgetragen, analysiert und statistisch ausgewertet.

2.5. Operationen

Alle Operationen führte Dr. med. Anika Seniuk (Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) durch.

Assistierende Arbeiten an der Maus erfolgten durch mich.

2.5.1. Hygiene

Aufgrund des Immundefektes der Rag-1^{-/-} Linie wurde bei diesen Tieren der gesamte OP-Prozess unter einer Produktschutzwerkbank¹⁴ durchgeführt. Weiterhin wurde durch regelmäßige Händedesinfektion des Operateurs und zwischenzeitliche Desinfektion der verwendeten Arbeitsgeräte unter der Werkbank auf besondere antiinfektiöse Hygiene geachtet. Benötigtes Werkzeug wurde vor den Operationen autoklaviert und steril abgepackt gelagert. Der OP-Tisch und eingesetzte Geräte wurden mit Ethanol 80% desinfiziert.

¹³ Microsoft Corporation, USA

¹⁴ Heraeus Instruments, Deutschland

2.5.2. Telemetriesenderimplantation

2.5.2.1. Sendervorbereitung

Zwecks Eichung des Telemetriesenders wurde das gesamte Gerät 24h lang bei atmosphärischem Umgebungsdruck in 0,9%ige Kochsalzlösung¹⁵ eingelegt und eingeschaltet. Die Daten wurden über die gesamte Zeit aufgezeichnet. Die Nullpunktabweichung des Drucks während der Messung wurde abgelesen und kontrolliert. Eine Abweichung von +/- 4 mmHg wurde toleriert. Sender mit größerer Abweichung waren zu verwerfen.

2.5.2.2. Anästhesie

Die Mäuse wurden mit einem selbst angefertigten Ketamin¹⁶-Xylazin¹⁷-Gemisch (1,6 mg Xylazin + 12 mg Ketamin ad 1 mL 0,9% Kochsalzlösung¹⁵) anästhesiert. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert mit 0,01 mL / g[Mausgewicht, MG], entsprechend einer Ketamindosis von 120mg/kg[MG] sowie einer Xylazindosis von 16mg/kg[MG]. Nach intraperitonealer Injektion wurde die Maus bis zum Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe in den Käfig überführt. Die Narkosetiefe wurde mittels Zehenkneifreflex überprüft. Zur Prophylaxe von Infektionen wurden gewichtsadaptiert als subkutane Injektion das Antibiotikum Enrofloxacin¹⁸ (5 mg/kg[MG]), zur peri- und postoperativen Analgesie Carprofen¹⁹ (8,25 mg/kg[MG]) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung¹⁵ verabreicht.

2.5.2.3. Vorbereitung und Lagerung

Nach Rasur des Operationsfeldes und Desinfektion mit Povidon-Iod-Lösung 50%²⁰ wurde die narkotisierte Maus in Rückenlage auf einer Korkunterlage platziert. Mit einem Bindfaden wurden die oberen Schneidezähne umschlungen und mit Klebeband an der Korkplatte fixiert. Unter dem Nacken der Maus befand sich eine zusammengerollte Wundkomresse, sodass der Hals leicht überstreckt war. Die Hinterbeine wurden mit Klebeband auf der Unterlage fixiert. Die Korkplatte selbst befand sich beweglich auf einem auf 38°C geregelten OP-Heizplatten-System²¹.

¹⁵ B.Braun, Deutschland

¹⁶ Albrecht, Deutschland

¹⁷ Bayer, Deutschland

¹⁸ Baytril 2,5%®, Bayer, Deutschland

¹⁹ Rimadyl®, Pfizer, USA

²⁰ Betaisodona, Mundipharma, Deutschland

²¹ F3, Haake, Deutschland

2.5.2.4. Eingriff

Als Zugangsgefäß für die Implantation des Katheters in die Aorta diente die linke Arteria carotis communis. Der Vorteil dieses Gefäßes gegenüber der Gegenseite zum Erreichen der Aorta ist ihr direkter Ursprung aus dem Arcus Aortae. Zum Erreichen der Arterie erfolgte eine etwa 1-2cm lange sagittale episternale Hautinzision. Vor der eigentlichen Präparation der Arterie wurde an der linken Körperflanke mittels Metzenbaumschere²² eine subkutane Tasche präpariert in die später die Sendeeinheit verlegt wurde. Danach erfolgte unter Mikroskopsicht²³ die Präparation der linken Arteria carotis communis. Das umliegende, überwiegend aus Speicheldrüsen und Fett bestehende Gewebe wurde mittels zweier Feinpinzetten²² zur Seite verlagert. Eine speziell gebogene autoklavierte Sicherheitsnadel diente als Wundspreizer, sodass auf tiefere Strukturen freie Sicht war. Es war darauf zu achten, dass andere Strukturen in der Gefäß-Nerven-Straße (Nervus Vagus, Vena jugularis interna und sonstige größere Begleitgefäße) nicht verletzt werden. Nach Erreichen des Zugangsgefäßes wurde es von umliegendem Bindegewebe vorsichtig befreit und mit autoklavierten Fäden unter leichter Spannung fixiert. Vor der Punktion des Gefäßes erfolgte eine Bindfaden-Ligatur wenige Millimeter proximal der Bifurkation zur Arteria Carotis interna und externa. Mit einer abgewinkelten Injektionsnadel¹⁵ [24g] wurde das Gefäß direkt proximal der Bifurkation punktiert. Die Kanülenspitze diente als Führung für den Katheter, welcher im eröffneten Gefäß nach proximal vorgeschoben wurde. Anhand von Markierungen entlang des Katheters konnte festgestellt werden, wie weit der Katheter vorgeschoben wurde. Je nach Mausgröße musste die Vorschubweite zwischen 1,0 und 1,4cm variiert werden, damit sich die Katheterspitze an der richtigen Position in der Aorta befand. Der Katheter wurde anschließend reversibel mit Fäden am Gefäß fixiert. Es folgte die Überprüfung des Blutdrucksignals intraoperativ an der narkotisierten Maus auf der Messplatte. Eine erfolgreiche Katheterimplantation wurde durch das Messen von erwartungsgemäßen aortalen Blutdruckamplituden festgestellt. War dies nicht der Fall, wurde der Katheter nachjustiert und erst dann endgültig fixiert.

Final wurden die Fixationsknoten mit HISTOACRYL® Gewebekleber¹⁵ benetzt und dadurch nochmals fest fixiert. Die Sendeeinheit konnte schließlich in die vorpräparierte Tasche an der linken Körperflanke verlegt werden. Es folgte eine Einzel-

²² Fine Science Tools, Deutschland

²³ OP-Mikroskop MZ 75 Leica, Deutschland

knopfnah mit Mersilene 5.0 Nahtmaterial²⁴ mittels 5 – 8 Knoten. Als direkt postoperativen Ernährungsersatz erhielt anschließend jede Maus subkutan 1mL eines 1:1 Gemisch aus 0,9%iger Kochsalzlösung¹⁵ und 5%iger Glukoselösung¹⁵. Nach der Operation wurde jede Maus zurück in Ihren ursprünglichen Käfig überführt. Von extern wurde für die Dauer der Aufwachphase mittels einer Rotlichtlampe oder Wärmeplatte eine Auskühlung verhindert.

2.5.2.5. Postoperative Phase

60 - 90 min nach Narkoseeinleitung erwachten die Tiere von selbst und erhielten bei vollständiger Wachheit zusätzlich zum normalen Futter mit Glukoselösung 5%¹⁵ aufgeweichtes Futter²⁵ und Glukoselösung 5%¹⁵ in Trinknapfen. Mehrmals täglich erfolgten Kontrollen des allgemeinen Gesundheitszustandes, der OP-Narbe und ggf. des Körpergewichts. Bei starker Manipulation der Naht wurden die Tiere erneut in Isuflurannarkose mit Einzelknopfnähten wundversorgt.

2.5.3. Subkutane Implantation der osmotischen Minipumpe

Die Angiotensin-II Infusion wurde mittels einer implantierten osmotischen Minipumpe durchgeführt. Sie lag subkutan an der zum Telemetriesender contralateralen Flanke und gab gleichmäßig das in Kochsalzlösung 0,9%¹⁵ gelöste Angiotensin-II über 14d lang in einer Dosierung von 490 ng/min/kg[MG] ab.

Osmotische Minipumpe und Angiotensin-II Dosierung

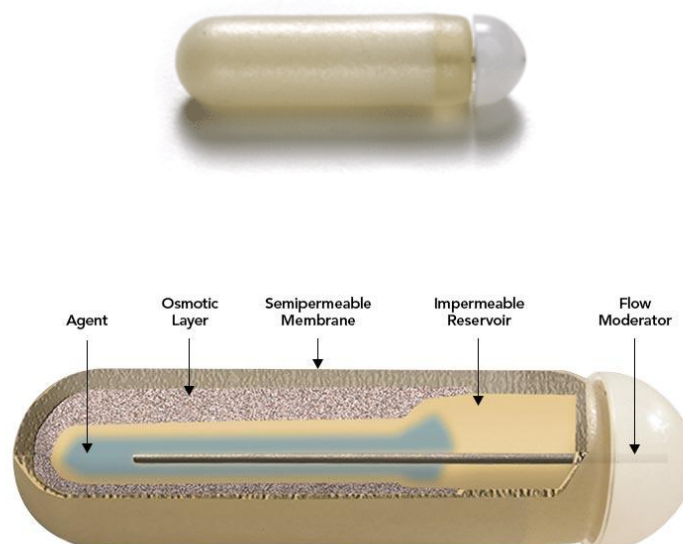


Abbildung 2-4: Osmotische Minipumpe, Original und Schema, Copyright: ALZET

²⁴ Ethicon, USA

²⁵ QC Diet Rod 16, Mausfutter, LAS Vendi, Deutschland

Kenndaten der osmotischen Pumpe

Modell	Gewicht (g)	Volumen (cm ³)	Minimales Tiergewicht	Infusionsdauer
Alzet 1002	0,4	0,5	Keine Angabe	2 Wochen

Tabelle 2-6: Kenndaten der osmotischen Pumpe

Die Pumpe besitzt ein Reservoir, das mit einer 1,0 mL Spritze¹⁵ und einem speziellen Kanülenaufsatz des Pumpenherstellers²⁶ mit Angiotensin-II-Lösung²⁷ befüllt werden kann. Mit einem Deckel und einem daran befindlichen Flussmoderator (siehe Abb. 6) wird die Öffnung des Reservoirs verschlossen. Um das Reservoir herum befindet sich eine sogenannte „Osmotic Layer“. Diese Schicht beginnt im Mausinneren aufgrund osmotischen Wassereinsogs aufzuquellen, sodass die Angiotensin-II Lösung wegen der von außen wirkenden Druckerhöhung durch den Flussmoderator (siehe Abb. 4) hindurch langsam und gleichmäßig in den Subkutanraum der Maus gepresst wird. Die Pumprate war für jede Charge vom Hersteller definiert. Sie lag zwischen 0,24 – 0,25 µL/min. Die Angiotensin-II-Konzentration der Lösung wurde pumpenspezifisch und gewichtsadaptiert für die Mäuse gewählt, sodass sich eine Dosierung von 490 ng/kg[MG]/h ergab. Nach Befüllung der Pumpen wurden diese bis zur Implantation für wenige Stunden in steriler 0,9%iger Kochsalzlösung¹⁵ gelagert.

2.5.3.1. Anästhesie

Die Tiere wurden an einer aus einem Schlauch und einem Falcon-Tube konstruierten Atemmaske mit einem Isofluran²⁸-Luft-Gemisch anästhesiert. Die Luft in der direkten Umgebung der Maus wurde kontinuierlich durch eine Saugpumpe abgesaugt und durch einen Narkosegasfilter geleitet, um den Operateur vor dem Narkosegas zu schützen. Die Dosierung erfolgte nach augenscheinlicher Kontrolle der Narkosetiefe (Atemfrequenz, Reaktion auf Schmerzreize) am Isofluranverdampfer²⁹. Die Dosis lag zwischen 1,5-2,5 Vol. % Isofluran. Sobald die Maus keinen Zehenkneifreflex mehr zeigte, wurde mit dem Eingriff begonnen.

²⁶ ALZET Osmotic Pumps, USA

²⁷ Sigma Aldrich, USA

²⁸ Forene 100%, Abbott, USA

²⁹ Dräger Medical, Deutschland

2.5.3.2. Eingriff

Als Zugang zum Subkutanraum diente eine ca. 5mm lange horizontale Haut Incision in der Nuchalregion. Diese Region wurde vorher rasiert und mit Povidon-Iod-Lösung 50%²⁰ desinfiziert. Mit Hilfe einer Metzenbaumschere²² wurde durch die Inzision hindurch eine Tasche an der zum Telemetriesender kontralateralen Flanke präpariert. In diese konnte danach die Minipumpe verlegt werden. Die Öffnung der Pumpe zeigte dabei nach kaudal, um eventuelles Austreten von Angiotensin-II Lösung aus der Wunde zu vermeiden. Die Wunde wurde mit 3-4 Einzelknopfnähten verschlossen. Als Nahtmaterial diente Mersilene 5.0²⁴. Die verschlossene Wunde wurde erneut mit Povidon-Iod-Lösung 50%²⁰ desinfiziert. Nach erfolgreichem Eingriff wurde die Maus in Ihren ursprünglichen Käfig zurück überführt und erwachte nach spätestens 2-3 min von selbst.

2.5.3.3. Postoperative Phase

Nach der Operation erfolgten tägliche Kontrollen der OP-Wunde und des Gesundheitszustandes der Maus. Traten Nahtinsuffizienzen auf wurden diese erneut unter Isofluran-Narkose wundversorgt.

2.6. Histologie, Molekularbiologie & FACS

2.6.1. Organentnahme

Nach Abschluss der hämodynamischen Versuche wurden die Mäuse unter hoch dosierter Isoflurannarkose getötet und bestimmte Organe entnommen.

Folgende Organe wurden analysiert:

- **Ohrbiopsie**
 - Aus einem Ohrbiopsat wird Genmaterial zur Feststellung des Genotyps gewonnen.
- **Blut**
 - Im Blut wird mit Hilfe des FACS die Existenz bzw. nicht-Existenz von adulten T-Lymphozyten nachgewiesen.
- **Herz**
 - Das Herz als zentrales Organ des Kreislaufsystems wird auf hypertoniebedingte Endorganschäden biometrisch und histologisch untersucht.

- **Aorta**
 - Die Aorta als Teil des Gefäßsystems wird hinsichtlich morphologischer und funktioneller Endorganschäden untersucht.
- **Nieren**

2.6.2. Ventrikelgewicht

Aufgrund unscharfer Begrenzungen zwischen Vorhöfen, Venae pulmonales und Venae cavae wurden beide Vorhöfe unter Mikroskopsicht standardisiert abgetrennt. Das Herzgewicht setzte sich demnach nur aus dem Gewicht beider Ventrikel zusammen, welche mit einer ISO 9001 Feinwaage³⁰ gewogen wurden.

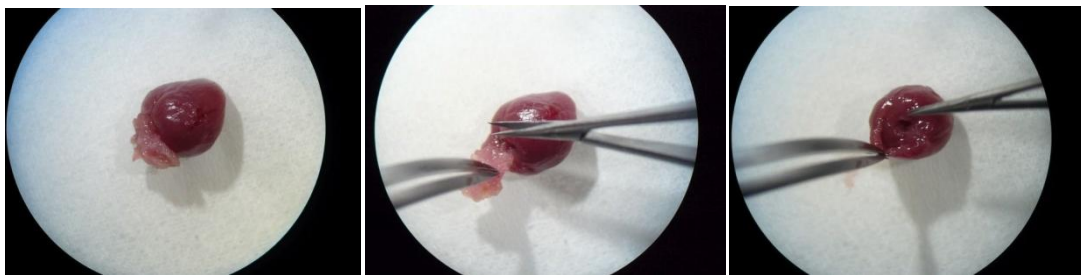


Abbildung 2-5: Ventrikelpräparation zur Gewichtsbestimmung

2.6.3. Histologie

Herz und Aorta wurden histologisch auf Hypertrophie und Schädigungen untersucht. Die Färbungen wurden durchgeführt von der „Mousepathology Facility“ (Leitung, 2012: Dr. med. Melanie Neumann) des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

2.6.3.1. Herz

Die Herzen wurden nach Bestimmung des Gewichts in Roti[®]-Histofix 4 %³¹ (Phosphatgepufferte Formalinlösung) eingelegt und an die „Mousepathology Facility“ zur Schnitt-Herstellung und Färbung geschickt.

Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

- 1) Hämatoxylin-Eosin (H.E.), *histologische Übersichtsfärbung*
- 2) Picrosirius Red, *Anfärbung von Kollagen*
- 3) Anti-CD3 Immunhistochemie, *Anfärbung von T-Lymphozyten*

³⁰ Sartorius, Deutschland

³¹ Carl Roth, Deutschland

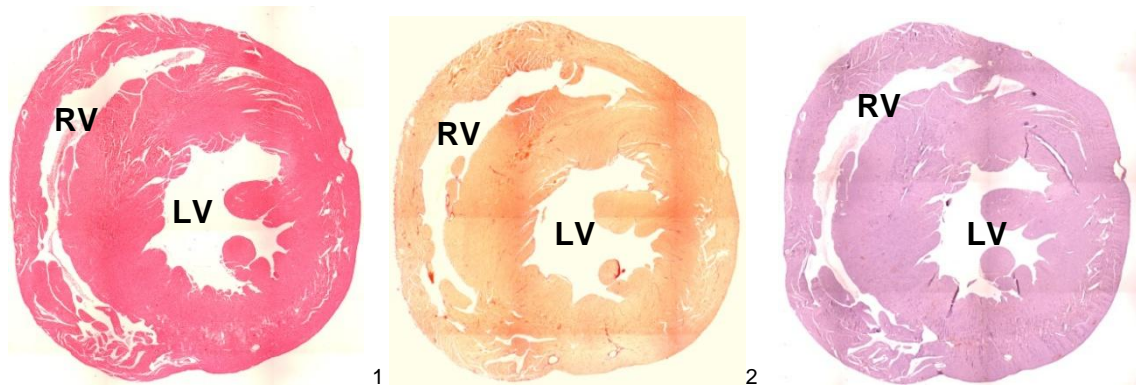


Abbildung 2-6: Histologische Schnitte eines Herzen einer unbehandelten C57BL/6J Maus. Dargestellt: Linker Ventrikel (LV) mit Papillarmuskel, rechter Ventrikel (RV); 1. H.E. 2. PSR 3. Anti-CD3.

PSR-Score

Die gefärbten Schnitte wurden in dieser Arbeit auf Anzeichen interstitieller Fibrose untersucht. Als Fibrose-Marker diente eine Picrosirius-Red-Färbung, welche kollagenreiche Strukturen rot und Muskulatur bronzefarben erscheinen lässt (siehe Abb. 2-9).

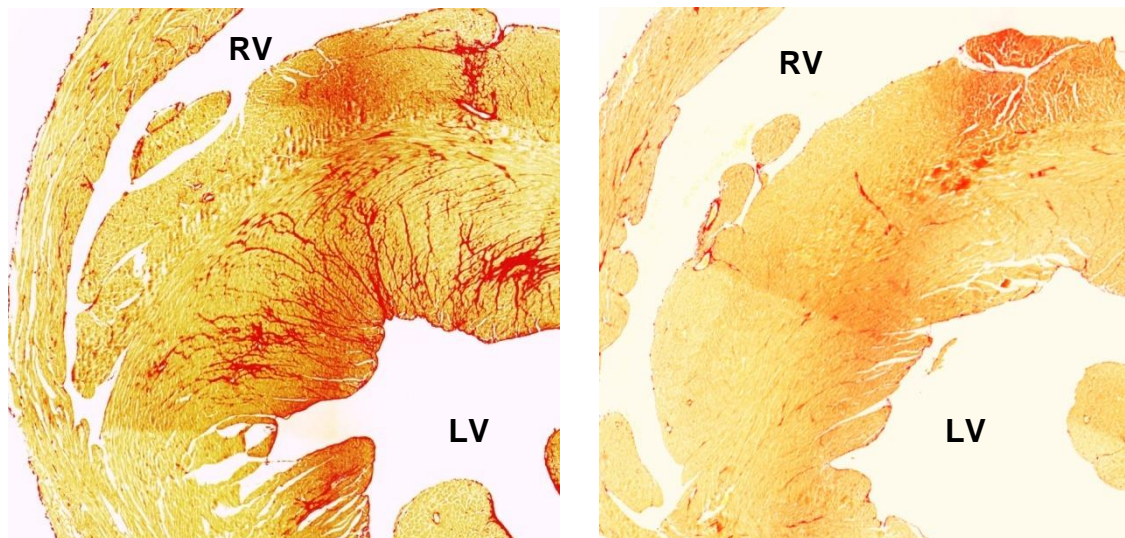


Abbildung 2-7: Exemplarischer Vergleich zweier repräsentativer Septen in der PSR-Färbung. Kollagene Fasern erscheinen deutlich rot. Links C57BL/6J nach 14-tägiger Angiotensin-II Behandlung, rechts: C57BL/6J ohne Behandlung. RV: Rechter Ventrikel, LV: Linker Ventrikel.

Die Quantifizierung erfolgte nach einem standardisierten Schema: Pro Präparat wurden unter 40-facher Vergrößerung zehn Gesichtsfelder, welche zusammengekommen das gesamte Präparat abdeckten, eingestellt und einzeln nach einem bestimmten Schema (siehe Tabelle 3-2) „gescored“. Aus den einzelnen „Gesichtsfeld-Scores“ wurde für jedes Präparat der Mittelwert errechnet und protokolliert.

Schema:

PSR-Score	Histologisches Korrelat
0	Keine oder nur wenige (physiologische*) kollagene Strukturen
1	Vermehrtes Auftreten kollagener Strukturen
2	Deutlich vermehrtes Auftreten kollagener Strukturen

*Endokard, Muskelfaszien, Herzklappen und Gefäße weisen auch physiologisch einen hohen Kollagengehalt auf.

Tabelle 2-7: PSR-Score

Die mikroskopische Betrachtung erfolgte verblindet durch drei Beobachter, um subjektive Bias zu vermeiden.

2.6.3.2. Aorta

Aus Teilen der Aorta thoracica wurden histologische Schnitte in einer Elastica-Van-Gieson Färbung (E.V.G) angefertigt. In E.V.G. erscheinen elastische Fasern als schwarze Struktur. In den vorliegenden Präparaten interessierten die Laminae elasticae, welche sich bei der Maus zahlreich in der Media aortae befinden und aus elastischen Fasern bestehen. Die äußerste und innerste Lamina elastica begrenzen die Media aortae. Dadurch ist es möglich, die Mediafläche genau zu quantifizieren und objektiv vergleichbar zu machen. Die Präparate wurden mit einer in das Mikroskop³² integrierten Kamera³² digitalisiert. In der Kamerasoftware³² wurde zunächst eine Längeneichung mit einem Eichobjekträger (Neubauerkammer) durchgeführt. Die Messung der Fläche wurde mit dem Programm ImageJ 1.47f³³ Fiji durchgeführt. Die äußerste und innerste Lamina elastica wurde per Hand umfahren und die eingeschlossene Fläche vom Programm errechnet. Die Differenz aus der äußeren und inneren Fläche ergab die Mediafläche.

2.6.4. Relaxationsfähigkeit der Aorta im Myographen

Zur Überprüfung der Gefäßfunktion wurde eine isometrische Kontraktilitätsmessung an Teilen der Aorta thoracica mit Hilfe eines Myographen durchgeführt. Diese Methodik soll auf Gefäßebene mögliche funktionelle Einschränkungen und Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufdecken.

³² Leica, Deutschland

³³ Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

2.6.4.1. Untersuchte Parameter

In der Myographie werden aus molekularbiologischer Sicht zwei Signalkaskaden überprüft: Die endothelabhängige Vasodilatation wird durch Aktivierung der M3-Rezeptoren mittels Acetylcholin (ACh) untersucht. Hierbei kommt es zur endothelialen Freisetzung von Stickstoffmonoxid, das auf die glatte Gefäßmuskulatur relaxierend wirkt. Die zweite Untersuchungsmethode zur Relaxationsfähigkeit verwendet direkt Stickstoffmonoxid in Form von Nitroglyzerin, sodass die endothelunabhängige Vasodilatation untersucht wird.

2.6.4.2. Myographie

Während der gesamten Messung wurden die Gefäße in einer Kammer (20mL), gefüllt mit selbstangefertigten Puffer (Krebs-Lösung, siehe Tabelle 2-9), und unter konstanter Begasung mit Carbogengas (5% CO₂, 95% O₂) gehalten. Die Zugabe des Cyclooxygenase-Inhibitors Indomethacin soll eine endogene Prostaglandinsynthese hemmen, damit keine endogenen vasoaktiven Substanzen das Ergebnis beeinflussen.

Reagenz	ρ [g/L]	Hersteller
NaCl	5,78	J.T. Baker, Niederlande
KCl	0,35	Merck, Deutschland
CaCl ₂	0,367	Merck, Deutschland
MgSO ₄	0,296	Merck, Deutschland
NaHCO ₃	2,625	Merck, Deutschland
KH ₂ PO ₄	0,175	Merck, Deutschland
7-D-Glucose	2,5	Merck, Deutschland
Indomethacin	1,192	Sigma Aldrich, USA

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Krebs-Lösung des Organbades

2.6.4.3. Vorbereitung der Aorten

Die Aorten wurden unter Mikroskopsicht von perivaskulärem Fettgewebe befreit.

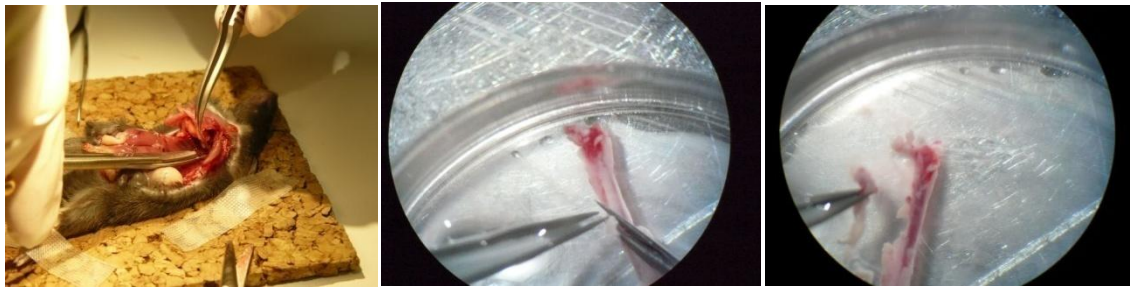


Abbildung 2-8: Präparation der thorakalen Mauseorta

Dabei war darauf zu achten keinen Zug oder mechanischen Druck auf das Gefäß auszuüben. Der Vorgang fand in eisgekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS₃₆) statt. Das Lumen wurde mit PBS durchspült und von Blutresten befreit. Aus der präparierten Aorta wurden zwei 4mm lange Stücke geschnitten.

2.6.4.4. Aufbau des Myographen

Die Aortenringe wurden im Myographen mit zwei Drahttriangeln aufgespannt.

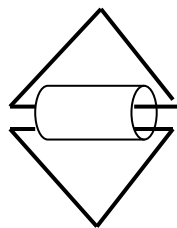
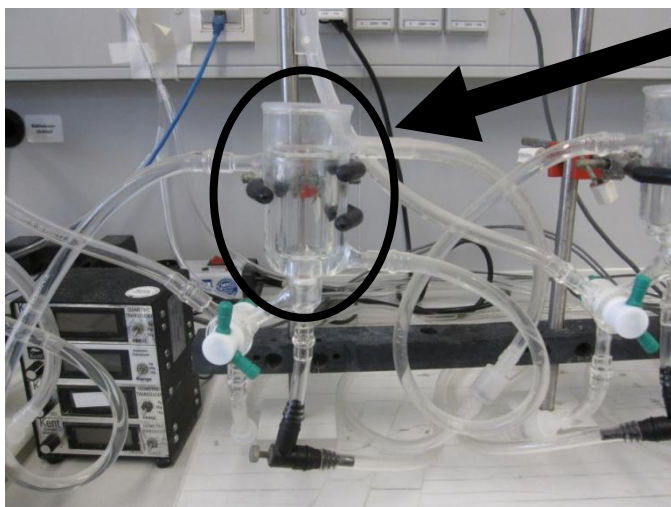


Abbildung 2-9: Schema, Aortenringe, eingehängt in zwei Drahttriangeln



Behältnis in das die Drahttriangeln eingespannt sind.

Zuführende Schläuche für die Pufferlösung und die Carbo-
gengaszufuhr

Abbildung 2-10: Aufbau Organbad und Myograph

2.6.4.5. Messung

Zunächst erfolgte eine Überprüfung der Gefäßvitalität. Die Gefäße wurden schrittweise auf eine Vorspannung von etwa 1,1g Gewichtskraftäquivalent eingestellt. Durch Zugabe von 2M KCl³⁴-Lösung sollte die glatte Muskulatur der Gefäße konstringiert werden, sodass nach kurzer Zeit ein Kraftanstieg registriert wird. Fand kein Anstieg der Kraft statt, war das Gefäß zu verwerfen. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Abschließend wurde das Organbad zwei Mal mit Krebslösung durchspült. Die abgelesene Spannung nach der Spülung wird als minimale detektierte Spannung (0%) definiert. Durch Zugabe von 2µL Prostaglandin F2α²⁷ wurde das Gefäß maximal kontrahiert. Nach Erreichen eines Spannungsplateaus wurde dieses als maximal mögliche Kraftentwicklung (100%) definiert. Nun erfolgte die Zugabe von Acetylcholin²⁷ bzw. Nitroglyzerin³⁴ in aufsteigenden Konzentrationen nach Schema: Alle 2 min nach Erreichen eines Plateaus wurde die Konzentration von ACh bzw. NTG erhöht (siehe Schema) erhöht.

Konzentrationsstufen von ACh/NTG im Organbad [mol/L]
$10^{-9,0}$
$10^{-8,5}$
$10^{-8,0}$
$10^{-7,5}$
$10^{-7,0}$
$10^{-6,5}$
$10^{-6,0}$

Die Messungen mit ACh und NTG fanden nacheinander statt. Zwischen den Messreihen wurde das gesamte System zwei Mal mit Krebs-Lösung durchspült. Direkt vor Messbeginn wurden die Gefäße erneut mit Prostaglandin F2α maximal kontrahiert. Über die gesamte Zweite der Messung wurden die erzeugten Kräfte durch einen Computer aufgezeichnet und in eine Excel-Tabelle exportiert.

Tabelle 2-9: Konzentrationsstufen im Organbad

2.6.5. Analyse des Bluts bezüglich Zellpopulation mit FACS

Die finale Blutentnahme fand unter tiefer Isoflurannarkose an der noch lebenden Maus statt. Mittels einer Glaskapillare wurden etwa 1,5mL Blut retrobulbär am Auge entnommen. Das Blut wurde dabei in ein 2,0mL EDTA Röhrchen³⁵ abgeleitet und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Zelluläre Anteile wurden spätestens 30min nach Blutentnahme abzentrifugiert, die zellulären Anteile wurden direkt im FACS weiter untersucht.

³⁴ Merck, Deutschland

³⁵ Sarstedt, Deutschland

FACS ist eine Methode zur genauen Charakterisierung einer Zellsuspension mit Hilfe eines Lasers gemischter Wellenlängen. Dabei wird jede einzelne Zelle individuell hinsichtlich Größe und Reflexionsverhalten sowie entstehender Fluoreszenz durch eine Antikörperfärbung analysiert und spezifisch einem Zelltyp zugeordnet. Dadurch kann die Anwesenheit bestimmter Zelltypen im Mausblut eindeutig nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit dient die FACS Messung zur Kontrolle der T-Lymphozyten-Defizienz im Blut von Rag-1^{-/-} Mäusen.

2.6.5.1. Aufbau & Funktionsweise des Durchflusszytometers

Die Zellsuspension wird in einem ständigen dünnen Flüssigkeitsstrom durch die Flusskammer geführt. Das System dient dazu, die Zellen so auszurichten, dass diese einzeln vom Laserstrahl bestrahlt werden. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle wird dieser u.a. je nach Größe, Granularität und Zellkernbeschaffenheit unterschiedlich stark gestreut und reflektiert. Dadurch können verschiedene Zelltypen voneinander unterschieden werden. Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) wird in 1-20° Abweichung vom Ursprungsstrahl durch eine Sammellinse gebündelt und auf einen Detektor (hier: Detektor I) geleitet. Rechtwinklig zum Ursprungsstrahl gestreutes Licht (Sideways Scatter, SSC) wird durch ein System aus halbdurchlässigen Spiegeln mehreren Detektoren zugeleitet.

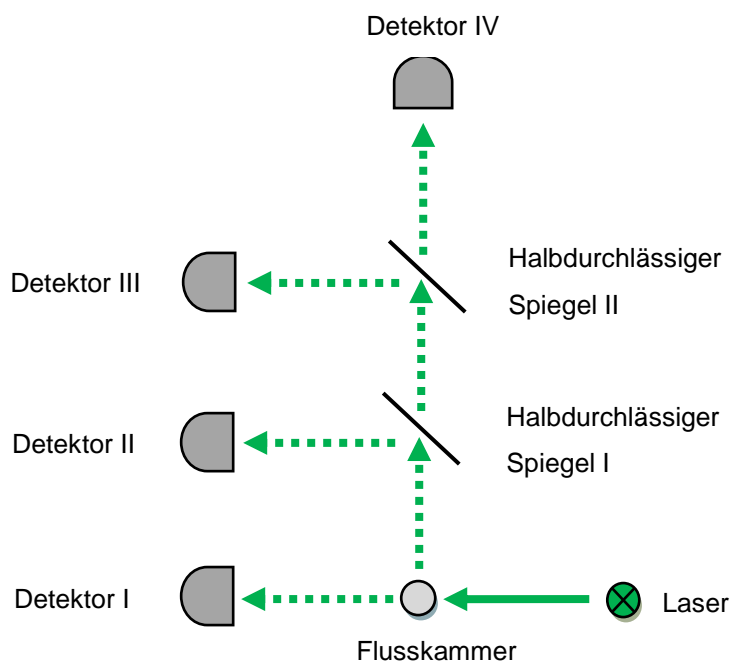


Abbildung 2-11: Schema, Vereinfachtes Funktionsprinzip des FACS

Die an den Detektoren aufgenommenen analogen Signale werden digital umgewandelt und am Computer in einem Dot-Plot Diagramm visualisiert. Dabei werden FSC (X-Achse) und SSC (Y-Achse) gegeneinander aufgetragen.

Das FSC ist hauptsächlich abhängig vom Volumen der Zelle, das SSC von Granularität, Vesikelanzahl und Zellkerngröße. Weiterhin kann bei Zellen nach vorheriger Antikörperfärbung durch unterschiedliche Fluoreszenzmuster auf ihren Gehalt an bestimmten Oberflächenmarkern geschlossen werden. Die Fluoreszenzen werden von speziell auf die jeweiligen Fluoreszenz-Wellenlängen gefilterten Detektoren aufgenommen. Die detektierten Zellen werden ebenfalls im Dot-Plot Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenzen sortiert, sodass spezifische Zelltypen visualisiert werden können.

Dot-Plot-Diagramm Beispiel

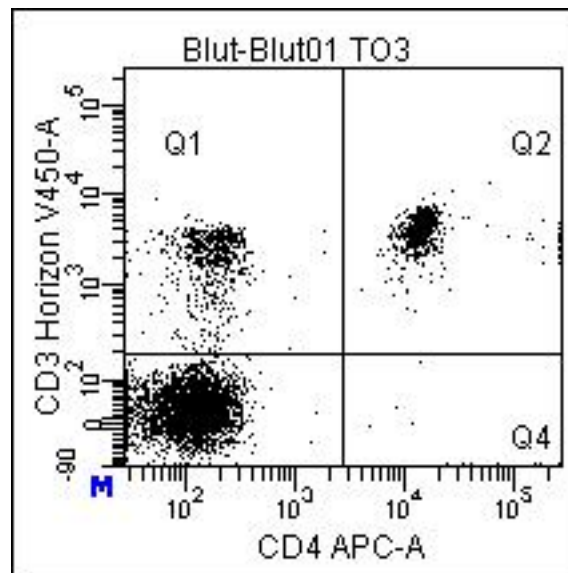


Abbildung 2-12: Beispiel für Dot-Plot Diagramm, nähere Erläuterung in 3.3

Untersuchte Oberflächenmarker in dieser Arbeit:

Oberflächenmarker	Benutzter Farbstoff	Vorkommen
CD45	PerCP, BDBioSciences, USA	Alle hämatopoetischen Zellen*
CD3	V450, BD BioSciences, USA	Thymozyten, T-Lymphozyten
CD4	APC, BD BioSciences, USA	Thymozyten, reife T-Lymphozyten

Tabelle 2-10: Übersicht der angefärbten Oberflächenmarker, *ausgenommen Erythrozyten

2.6.5.2. Probenvorbereitung

Zum genauen Nachweis der T-Lymphozyten-Defizienz wurden die zellulären Bestandteile des Bluts aus der finalen Blutentnahme mit oben genannten Antikörpern gefärbt.

Protokoll der Färbung:

- (1) Zunächst erfolgte die Antikörperfärbung durch Zugabe von 0,5µL Antikörpersuspension auf 50µL Blut (entsprechend 1:100 Verdünnung). Danach 20 min Lagerung bei 8°C.
- (2) Waschen in 1mL CellWash³⁶
- (3) Zentrifugation bei 300g, 5min bei 8°C, dekantieren des Überstandes
- (4) Zugabe von 2mL Erythrozyten-Lysis (NH₄Cl₂ / Tris.HCl, 10:1). 5min Lyse bei Raumtemperatur. Der osmotische Schock soll Erythrozyten zum Platzen bringen, da diese im FACS einen Störfaktor darstellen
- (5) Stoppen der Lyse durch Zugabe von 2mL PBS mit 1% fetalem Kälberserum
- (6) Zentrifugation bei 300g, 5min bei 8°C, dekantieren des Überstandes und Resuspension des Pellets in CellWash³⁶ (Reinigungsschritt)
- (7) Zentrifugation bei 300g, 5min bei 8°C, dekantieren des Überstandes und Resuspension des Pellets in 300µL PBS

Die FACS Messung der Suspension fand innerhalb von 18h nach der Färbung statt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde in Kooperation mit Dr. rer. nat. Hans-Joachim Paust, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, durchgeführt.

³⁶ BD Biosciences, USA

3. Ergebnisse

3.1. Vorwort zur Statistik

Die im Ergebnisteil angewendete visuelle Ergebnisdarstellung sowie die statistische Auswertung wurden mit dem Programm „Graphpad Prism 5.02“ der Firma Graphpad Software, Inc. erstellt. Als statistische Tests dienen die 1-Way-ANOVA, die 2-Way-ANOVA, der Newman-Keuls Multiple Comparison Test und der Bonferroni Post Test. Ein $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen. Für alle gemessenen Parameter wird eine Normalverteilung der Messergebnisse angenommen. Sämtliche Messergebnisse werden mit dem Standardfehler (SEM) ausgedrückt. Das jeweilige benutzte Testverfahren ist in den Beschreibungen der Darstellungen angegeben. Wichtige Befunde sind im Anhang zur besseren Übersicht zusammengefasst dargestellt.

1-Way-ANOVA & Newman-Keuls Multiple Comparison Test

Die 1-Way-ANOVA (analysis of variance), bzw. die einfaktorielle Varianzanalyse untersucht die Mittelwerte genau einer gemessenen Ausprägung für verschiedene Versuchsgruppen hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede. Dabei wird die Varianz zwischen den Gruppen mit der Varianz innerhalb der Gruppen verglichen. Um statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte von einzelnen Gruppen untereinander aufzudecken, wird ein Newman-Keuls Multiple Comparison Test durchgeführt, der beim Vergleich physiologischer Parameter häufig Anwendung findet.

2-Way-ANOVA & Bonferroni Post Test

Die 2-Way-ANOVA, bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse untersucht ähnlich wie die einfaktorielle Varianzanalyse die Mittelwerte von genau zwei Ausprägungen für verschiedene Versuchsgruppen hinsichtlich statistischer Signifikanz. In dieser Arbeit kam dieses Verfahren hauptsächlich beim Vergleich von Messergebnissen über einen bestimmten Zeitraum zur Anwendung. Als Variablen wurden der zeitliche Verlauf des jeweiligen physiologischen Parameters und die absolute Ausprägung des Parameters zwischen den Gruppen verglichen. Der Bonferroni post Test wurde genutzt um mögliche statistische Signifikanzen zwischen den physiologischen Parametern verschiedener Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt aufzudecken.

3.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung aller Mäuse vor und nach dem Experiment ergab eindeutig den jeweils zu erwartenden Genotyp. Verwechslungen können ausgeschlossen werden.

3.3. FACS

Es wurden bei jeweils n=4 Tieren jedes Genotyps am Versuchsende eine FACS Messung hinsichtlich dem Vorhandensein von T-Lymphozyten durchgeführt. Dort konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass im Blut der Rag-1^{-/-} Mäuse keine reifen CD4⁺ T-Lymphozyten zirkulieren. Die Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch den FACS-Befund einer Wildtyp Maus (T03) und einer Rag-1^{-/-} Maus (T07). Das eindeutige Vorhandensein von Zellen, die sowohl CD3 als auch CD4 auf Ihrer Oberfläche besitzen und dadurch mit ihrem spezifischen Fluoreszenzmuster in den Bereich Q2 fallen, beweist im Wildtyp die Existenz reifer T-Lymphozyten. Im Vergleich dazu zeigen Rag-1^{-/-} Mäuse im Einklag mit dem unten gezeigten FACS Befund keine im Blut zirkulierenden reifen T-Lymphozyten.

FACS Befund

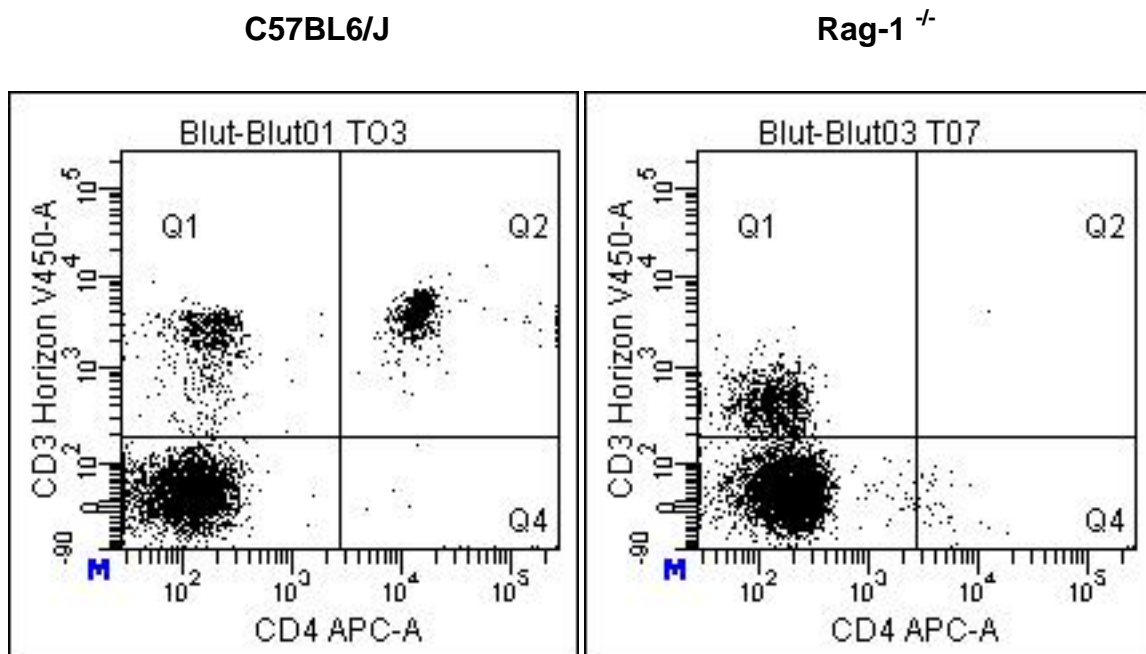


Abbildung 3-1: Dot-Plot Diagramm der FACS-Messung. Links: C57BL/6J, rechts: Rag-1^{-/-}. Jeder Punkt repräsentiert die Messung einer einzelnen Zelle. Der Wert auf der X-Achse beschreibt logarithmisch die Summe der Fluoreszenzintensität der an der jeweiligen Zelle haftenden Anti-CD4 Antikörper (APC-A). Die Y-Achse zeigt logarithmisch die Summe der Fluoreszenzintensität des an der jeweiligen Zelle haftenden Anti-CD3 Antikörpers (V450-A).

3.4. OP-Erfolg

Insgesamt wurden achtzehn Telemetriesenderimplantationen durchgeführt, von denen fünfzehn optimal verlaufen sind. Der optimale Verlauf zeichnete sich durch gute Vitalität der Maus nach und während der Operation sowie eine hohe Qualität des telemetrischen Blutdrucksignals aus.

OP-Statistik

Genotyp	Optimalverlauf	Telemetriedefekt	Perioperativer Tod*	Gesamt
C57BL6/J	7	1	2	10
Rag ^{1tm1Mom}	8	0	0	8
Gesamt	15	1	2	18

*Ein Tier wurde wegen eines hohen perioperativen Blutverlustes und beginnender Schnappatmung eingeschläfert, ein Tier verstarb unmittelbar postoperativ aus ungeklärter Ursache.

Tabelle 3-1: OP-Statistik

Zusammenfassend konnten sieben Tiere der C57BL6/J, sowie acht Tiere der Rag^{1tm1Mom} Linie in die Telemetriemessung eingeschlossen werden. Die einzige Maus mit einem Defekt des Telemetriesenders durchlief trotzdem das gesamte Versuchsprotokoll, sodass für die telemetrieunabhängigen Parameter ein n=8 Versuchstiere pro Gruppe erreicht wurde. Die Quote der erfolgreichen Operationen ist als sehr gut anzusehen. Das Verfahren stellte hohe Ansprüche an die Operateurin und eine mittelgradige Belastung für die Maus dar. Die Implantation der osmotischen Minipumpen verlief in allen Fällen ohne Komplikationen.

3.5. Mausvisiten

Während des Versuchs traten keine schwerwiegenden Probleme auf. Fünf Mäuse manipulierten nach der Telemetrie-OP an der vernähten Inzision. Diese wurden komplikationslos unter Isoflurannarkose erneut wundversorgt. Alle Tiere waren direkt postoperativ sichtlich geschwächt und wiesen leicht ungepflegtes Aussehen auf, welches jedoch den Umständen entsprechend nicht auffällig erschien. Eine C57BL/6J Maus zeigte einen grenzwertig hohen Gewichtsverlust und auffällig zurückgezogenes Verhalten. Unter täglicher Beobachtung und hochkalorischer Nahrungszufuhr normalisierte sich deren Zustand binnen 6 Tagen. Die Abbildung 3-2 zeigt das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere innerhalb der Versuchsgruppen an markanten Punkten der Studie.

Verlauf des Körpergewichts der Versuchsgruppen

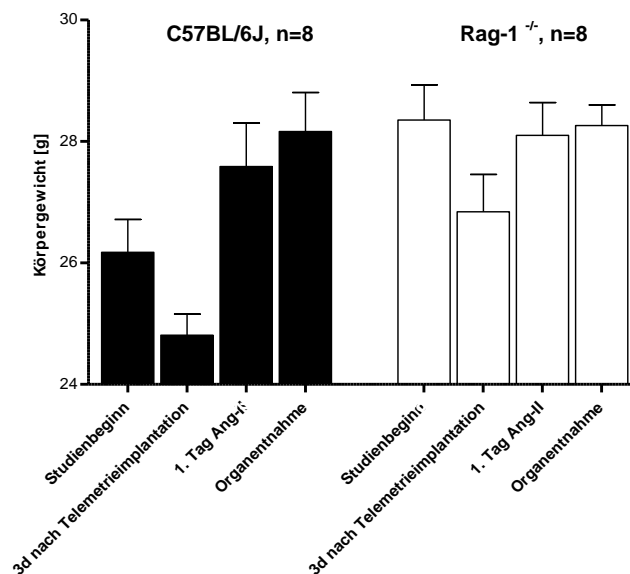


Abbildung 3-2: Balkendiagramm, Durchschnittliche Körpergewichte der Tiere in beiden Versuchsgruppen an markanten Studienzeitpunkten [Mittelwert +/- SEM]

Zu Beginn der Studie wiesen die Rag-1^{-/-} Mäuse mit durchschnittlich 28,35±0,58 g ein etwas höheres Körpergewicht auf als die im Durchschnitt 26,18±0,54g schweren C57BL/6J Mäuse. Nach Zuchtangaben beider Tierhaltungen waren alle Tiere zu diesem Zeitpunkt 12-14 Wochen alt. Nach der Telemetrie-OP verloren alle Mäuse ca. 5% ihres ursprünglichen Körpergewichts (C57BL/6J: - 5,3%, Rag-1^{-/-}: -5,2%). Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere bei Organentnahme war in beiden Versuchsgruppen in etwa gleich (C57BL/6J: 28,16±0,64g, Rag-1^{-/-}: 28,26±0,34g). Alle dargestellten Körpergewichte sind Nettogewichte, d.h. das Gewicht des Telemetriesenders (1,4g) und der osmotischen Pumpe (0,2g) wurden beim Zustand nach Implantation vom Bruttokörpergewicht subtrahiert.

3.6. Telemetrie während Basismessung und Ang-II Infusion

3.6.1. Körperliche Aktivität

Die folgenden Abbildungen zeigen die körperliche Aktivität als 12h-Mittelwerte errechnet aus den Telemetriedaten der Tag- (07:00 - 19:00) bzw. Nachtstunden (19:00-07:00) im Verlauf des gesamten Experimentes und als arithmetische Mittel im Balkendiagramm.

Körperliche Aktivität (KA)

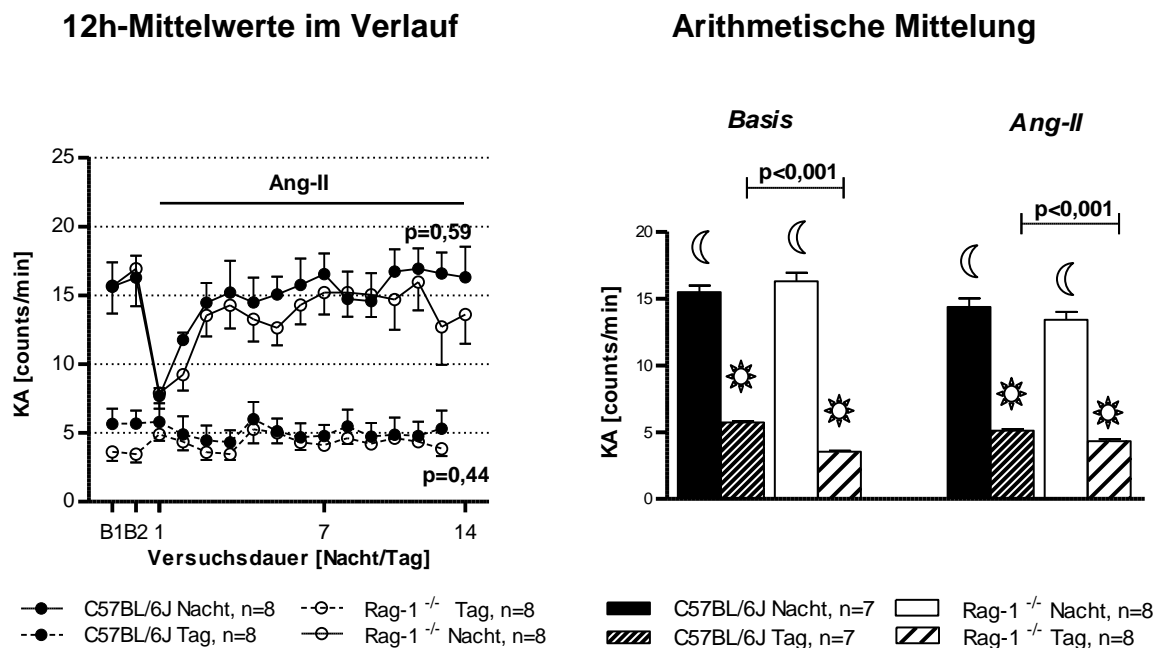


Abbildung 3-3: X-Y Diagramm, Darstellung der körperlichen Aktivität als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte bzw. Tage im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM], die Datenpunkte B1 und B2 repräsentieren die Basismessung.

Abbildung 3-4: Balkendiagramm, Arithmetische Mittelung der körperlichen Aktivität während Basismessung und Ang-II Infusion [Mittelwerte +/- SEM]. Als Datenquellen dienen die Messungen der beiden Tage der Basismessung, bzw. der Tage 7-14 der Ang-II Infusion.

In Abbildung 3-1 zeigt sich während der Tagstunden eine über das gesamte Experiment etwa gleichbleibende durchschnittliche Aktivität von $5,15 \pm 0,99$ counts/min bei Wildtypen und $4,35 \pm 0,52$ counts/min bei Rag-1^{-/-}. Da Mäuse nachtaktiv sind, zeigt sich während der Nachtstunden eine deutlich höhere Aktivität als am Tage. Hier zeigt sich für etwa 3 Tage nach der Implantation der osmotischen Minipumpe ein Einbruch der körperlichen Aktivität, was für eine vorübergehende Schwächung der Mäuse oder als eine Wirkung des Angiotensin-II nach der Operation spricht. Die über die gesamte Versuchsdauer gemessene durchschnittliche Aktivität in den Nachtstunden beläuft sich bei den Wildtypen auf etwa $14,37 \pm 1,48$ counts/min und

13,40±1,71 counts/min bei Rag-1^{-/-}. Eine 2-Way-ANOVA Testung und ein Bonferoni post Test ergaben zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen [p-Werte: siehe Abbildung].

Der Vergleich in Abbildung 3-2 zwischen Tag- und Nachtwerten zeigt bei beiden Gruppen unabhängig von der Behandlung eine deutlich vorhandene Tag- / Nachtrhythmik. Es fällt auf, dass Tiere des Rag-1^{-/-} Genotyps während der tagsüber andauernden Ruhephase in dieser Darstellung eine statistisch signifikant geringere Aktivität zeigen als Wildtypen [1-Way ANOVA, Newman-Keuls Multiple Comparison Test]. In der genaueren Darstellung des zirkadianen Verlaufs ist dieser jedoch nicht aufgetreten (s.u.). Alle gruppeninternen Vergleiche zwischen Tag- und Nachtaktivität sind statistisch hochsignifikant [1-Way ANOVA, Newman-Keuls multiple Comparison Test: Für alle Vergleiche zwischen Tag und Nacht gilt $p < 0,001$].

Die Abbildung 3-5 zeigt den Verlauf der gemessenen körperlichen Aktivität gemittelt aus einzelnen Tagen über einen virtuellen Tag. Als Datenquellen dienen die 1h- Mittelwerte beider Tage der Basismessung und die 1h-Mittelwerte der letzten sieben Tage während Angiotensin-II Infusion.

Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität, *Basismessung und Ang-II*

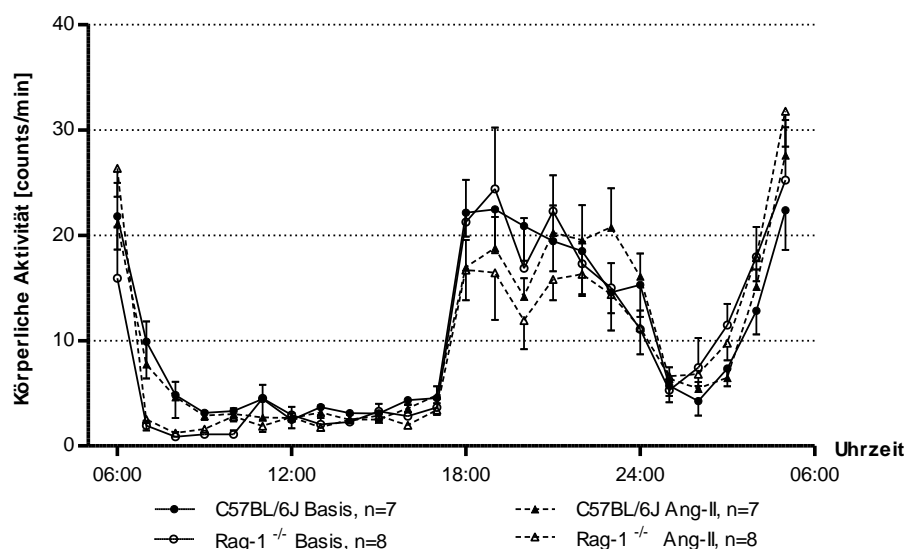


Abbildung 3-5: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der 1h-Mittelwerte der beiden Tage der Basismessung, bzw. der Tage 7-14 der Ang-II Infusion.

Im Zeitraum von 07:00 - 17:00 ruhten die Mäuse und zeigten kaum Aktivität. Während der Abendstunden und in der Nacht stieg diese an und verblieb über ca. 6 h auf einem hohen Niveau bis zu einem synchronen Abfall auf geringere Werte im Zeitraum von 01:00 – 03:00. Nach dieser kurzen Ruhephase traten erneut maxi-

male Werte gegen 05:00 auf. Mäuse sind von Natur aus nachtaktive Tiere [Li, et al. 1999]. Zu keinem Zeitpunkt fallen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf [2-Way-ANOVA, Basismessung, $p=0,69$; Ang-II, $p=0,54$].

3.6.2. Herzfrequenz

In den Abbildungen 3-6 und 3-7 ist in den jeweiligen Gruppen der Verlauf der Herzfrequenz über den gesamten Versuchszeitraum als Tag- (07:00 - 19:00) bzw. Nachtmittelwert (19:00-07:00) dargestellt.

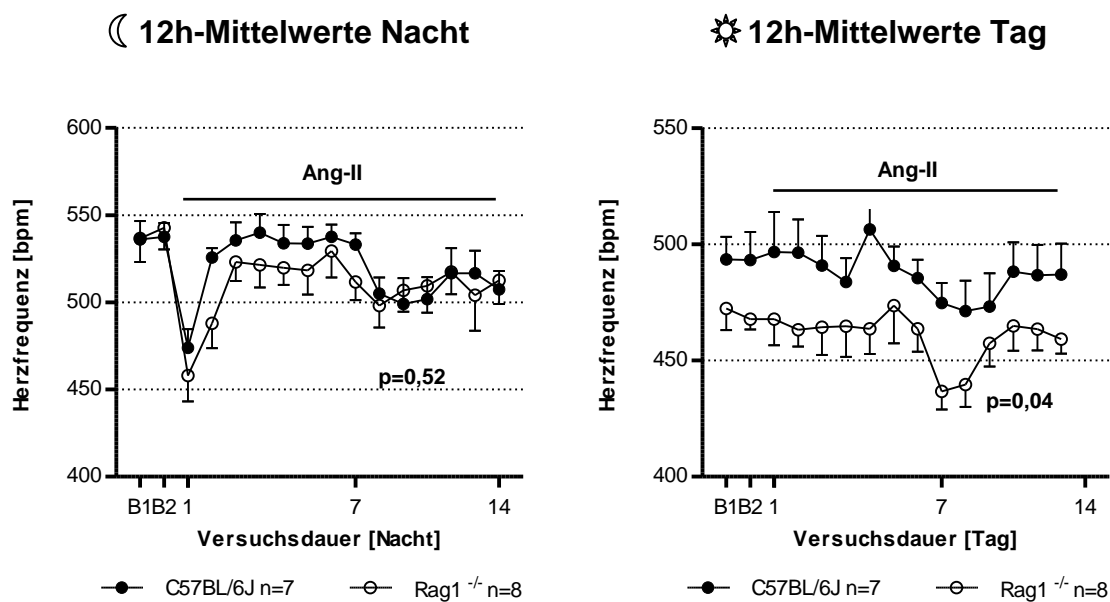


Abbildung 3-6: X-Y Diagramm, Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM], die Datenpunkte B1 und B2 repräsentieren die Basismessung.

Abbildung 3-7: X-Y Diagramm, Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM], die Datenpunkte B1 und B2 repräsentieren die Basismessung.

Es zeigt sich während der Tagstunden eine über das gesamte Experiment etwa konstante durchschnittliche Herzfrequenz von 480 ± 75 bpm bei Wildtypen und 453 ± 54 bpm bei Rag1^{-/-}. Es fällt auf, dass es an den Tagen 7 und 8 zu einer geringfügigen Absenkung der durchschnittlichen Herzfrequenz in beiden Gruppen kommt. Die Testung hinsichtlich eines unterschiedlichen Kurvenverlaufes beider Gruppen mittels 2-Way-ANOVA fiel mit einem p-Wert von 0,04 statistisch signifikant aus, in diesem Fall zeigte sich verglichen mit den Wildtypen eine geringere Herzfrequenz in den Rag1^{-/-} Mutanten. Wegen der beschriebenen Nachtaktivität der Mäuse zeigt sich erwartungsgemäß während der Nachtstunden eine deutlich höhere Herzfrequenz als am Tage. Hier zeigt sich für etwa 3 Tage nach der Implantation der osmotischen Minipumpe eine Absenkung der Herzfrequenz, was

vermutlich durch eine geringere körperliche Aktivität aufgrund einer Schwächung der Mäuse nach der Operation oder einer Angiotensin-II Wirkung zu erklären ist. Die durchschnittliche Herzfrequenz in den Nachtstunden beläuft sich bei den Wildtypen auf etwa 511 ± 81 bpm und 509 ± 97 bpm bei Rag-1^{-/-}. Eine 2-Way-ANOVA Testung und ein Bonferroni post Test ergaben hier zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

Die Abbildungen 3-8 und 3-9 zeigen die Abweichung der Herzfrequenz über die Dauer der Angiotensin-II Infusion gegenüber der während der Basismessung durchschnittlich gemessenen Herzfrequenz.

Δ Basis-Ang-II HF 12h-Mittelwerte

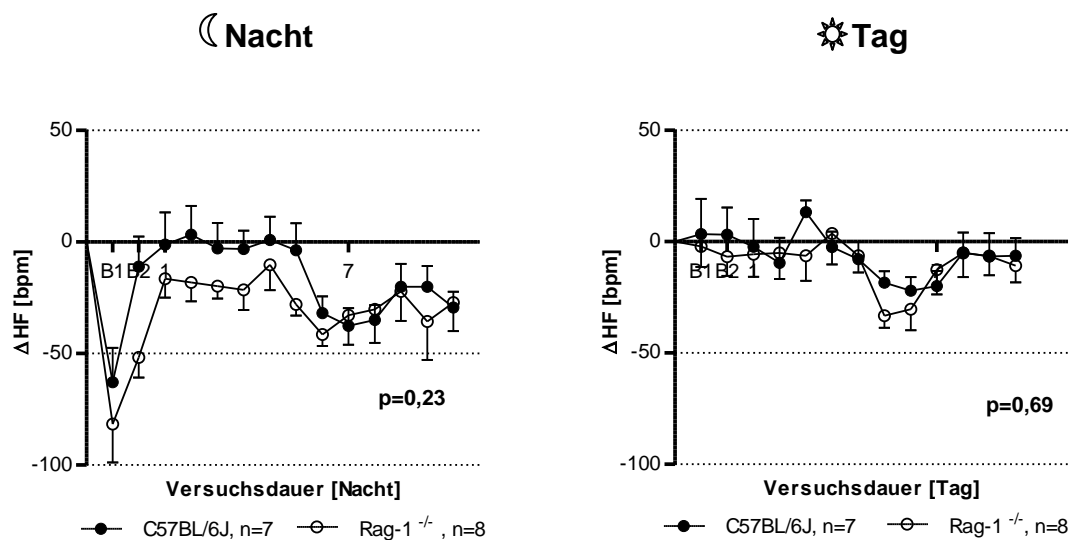


Abbildung 3-8: X-Y Diagramm, Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer als Abweichung von der durchschnittlichen Herzfrequenz während der Basismessung [Mittelwerte +/- SEM]. Die X-Achse entspricht als Nullpunkt der während der Basismessung gemessenen durchschnittlichen Herzfrequenz während der Nachtstunden.

Abbildung 3-9: X-Y Diagramm, Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer als Abweichung von der durchschnittlichen Herzfrequenz während der Basismessung [Mittelwerte +/- SEM]. Die X-Achse entspricht als Nullpunkt der während der Basismessung gemessenen durchschnittlichen Herzfrequenz während der Tagstunden.

Auch in dieser Darstellung zeigt sich, dass die durchschnittliche Herzfrequenz der Versuchstiere beider Genotypen in den ersten Nächten nach Implantation der osmotischen Minipumpe deutlich sinkt und sich dann wieder dem durchschnittlichen Wert der Basismessung annähert. Jedoch ist festzustellen, dass sich die durchschnittliche Herzfrequenz in den letzten Tagen eher etwas unterhalb (ca. -25bpm) der Nulllinie (Durchschnitt während Basismessung) befindet. Auch hier kann kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen mit einer 2-Way-ANOVA Testung festgestellt werden. Es zeigt sich weiterhin, dass

tagsüber die Herzfrequenz beider Genotypen im Verlauf der Angiotensin-II Infusion kaum von der durchschnittlichen Herzfrequenz während der Basismessung abweicht. Zwischen den Versuchsgruppen ist in diesem Fall ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied mit gleicher Testung festzustellen. Abbildung 3-10 zeigt den Verlauf der gemessenen Herzfrequenz gemittelt über einen virtuellen Tag. Als Datenquellen dienen die 1h- Mittelwerte beider Tage der Basismessung und die 1h-Mittelwerte der letzten sieben Tage während Angiotensin-II Infusion.

Zirkadianer Verlauf der Herzfrequenz, *Basismessung und Ang-II*

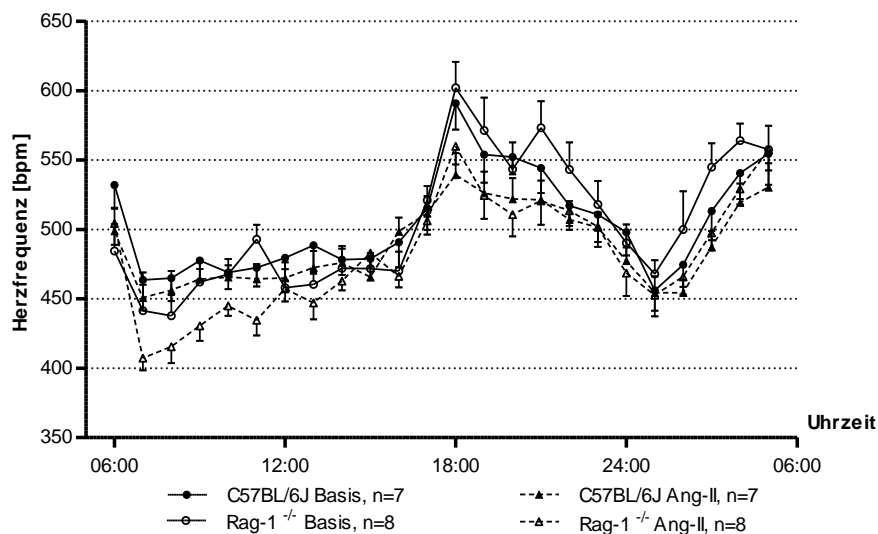


Abbildung 3-10: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der Herzfrequenz im Gruppenvergleich [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der zur jeweiligen Stunde der beiden Tage der Basismessung, bzw. der Tage 7-14 der Ang-II Infusion gemessenen Daten.

Der zirkadiane Verlauf der Herzfrequenz zeigt wie die körperliche Aktivität eine deutliche Tag-Nacht-Rhythmik. Sowohl während der Basismessung, als auch während Ang-II Infusion befindet sich die Herzfrequenz während der Nachtstunden auf einem deutlich höheren Niveau als am Tage. Eine leichte Absenkung ist zwischen 24:00 und 02:00 erkennbar. Minimale Werte herrschen bei 07:00, maximale bei 18:00. Der größte ersichtliche Unterschied zwischen beiden Gruppen liegt während der Ang-II Infusion zwischen 07:00 und 09:00. Zu allen restlichen Zeiten zeigen die Gruppen nahezu synchrone Verläufe. Eine 2-Way ANOVA Testung hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Genotypen fiel nicht signifikant aus.

Abbildung 3-11 zeigt als Balkendiagramm die in den jeweiligen Teilzeiträumen durchschnittlich herrschende Herzfrequenz der Versuchstiere innerhalb der Versuchsgruppen.

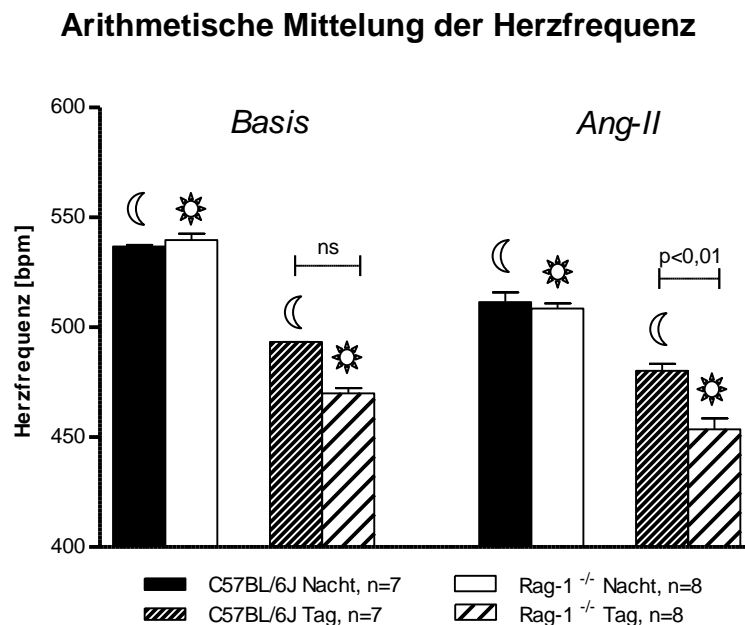


Abbildung 3-11: Balkendiagramm, Arithmetische Mittelung aller mittlerer Herzfrequenzen während Basismessung und Ang-II Infusion [Mittelwerte +/- SEM]. Als Datenquellen dienen die Messungen der beiden Tage der Basismessung, bzw. der Tage 7-14 der Ang-II Infusion.

Die Herzfrequenz zeigt ebenfalls im Einklang mit der körperlichen Aktivität eine Tag-Nacht-Rhythmik. Eine statistische Testung [1-Way ANOVA, Bonferroni's multiple Comparison Test: Basismessung Tag, C57BL/6J, n=7 vs. Basismessung Tag, Rag1^{-/-}, n=8] der arithmetischen Mittelungen ergab eine signifikante Abweichung der am Tage gemittelten Herzfrequenzen zwischen beiden Gruppen während der Ang-II Infusion [t= 5,167]. Die gleiche Gegenüberstellung während der Basismessung zeigt im Balkendiagramm einen augenscheinlichen Unterschied, jedoch keine statistische Signifikanz [t=2,469].

3.6.2.1. Korrelation der Herzfrequenz mit der körperlichen Aktivität

Der ähnliche Kurvenverlauf der körperlichen Aktivität, sowie des mittleren arteriellen Drucks lassen auf einen Korrelation beider Parameter schließen. Die folgenden Abbildungen beinhalten auf zwei Y-Achsen verteilt sowohl die körperliche Aktivität, als auch den zeitgleich ermittelten MAP.

Zirkadianer Verlauf, KA vs. HF

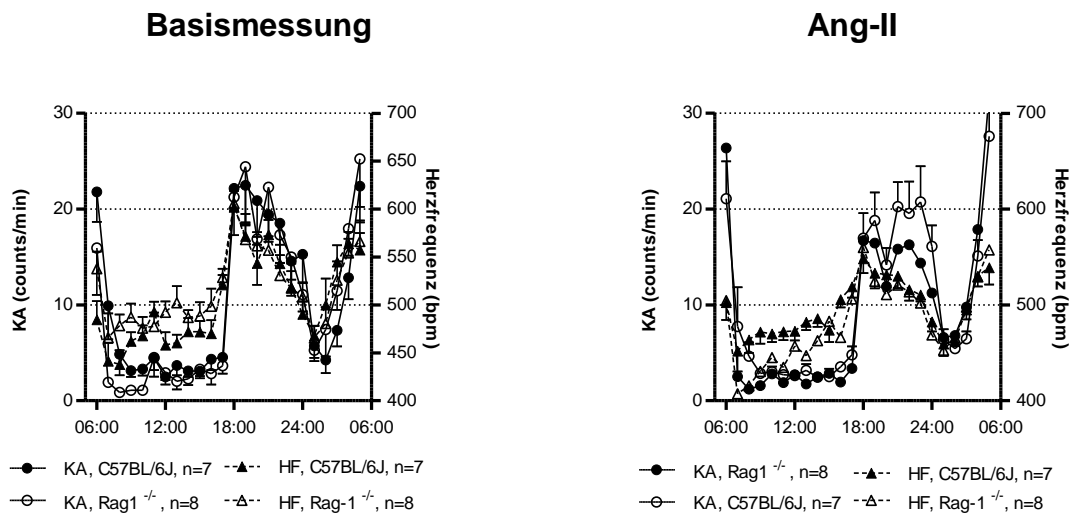


Abbildung 3-12: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. HF im Gruppenvergleich während Basismessung [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der 1h-Mittelwerte der beiden Tage der Basismessung.

Abbildung 3-13: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. MAP im Gruppenvergleich während Ang-II Infusion [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der 1h-Mittelwerte der Tage 7-14 der Ang-II Infusion

Es zeigt sich augenscheinlich eine deutliche Korrelation zwischen körperlicher Aktivität und mittlerer Herzfrequenz. In der tagsüber andauernden Ruhephase senkt sich in beiden Gruppen das HF-Niveau deutlich gegenüber der nächtlichen Aktivitätsphase ab. Beide Versuchsgruppen reagieren gleichermaßen. Auch während der Ang-II Infusion bleibt die Korrelation zwischen körperlicher Aktivität und HF vorhanden. Die HF verläuft auf einem geringfügig niedrigeren Grundniveau. Eine 2-Way-ANOVA Testung hinsichtlich etwaiger Gruppenunterschiede fällt nicht signifikant aus.

3.6.2.2. Aktivitätsnormierte Herzfrequenz

Die aktivitätsnormierte Auswertung der Herzfrequenz basiert auf der Einteilung der körperlichen Aktivität in sechs Aktivitätscluster. Tabelle 3-2 zeigt die Grenzwerte für die jeweiligen Cluster. Mit dieser Form der Auswertung soll versucht werden die zur jeweiligen Aktivitätsstufe herrschende Herzfrequenz zwischen den Gruppen vergleichbar zu machen. Dadurch sollen mögliche Unterschiede der körperlichen Aktivität als Ursache für etwaige Unterschiede in der Herzfrequenz aufgedeckt werden.

Grenzwerte für Aktivitätscluster [Counts/min]		
(jeweils von ... bis)		
0	-1	0,1
1	0,1	5,1
2	5,1	10,1
3	10,1	15,1
4	15,1	20,1
5	20,1	25,1
6	25,1	30,1
7	30,1	200

Tabelle 3-2: Grenzwerte der benutzten Aktivitätscluster [Counts/min]

Als Datenquelle dienen sämtliche alle 5 Minuten gewonnenen 1min-Mittelwerte aus Aktivität und gleichzeitig bestimmter zugehöriger Herzfrequenz. Für jedes Versuchstier wurden die individuellen mittleren Werte der Herzfrequenz, die während des jeweiligen Aktivitätsniveaus herrschten, arithmetisch gemittelt. So erhielt zunächst jedes Tier einzeln eine für das jeweilige Aktivitätscluster gemittelte Herzfrequenz. In den folgenden Diagrammen wurden diese individuellen Aktivitätscluster-Herzfrequenz-Mittel innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen arithmetisch gemittelt um eine Vergleichbarkeit beider Versuchsgruppen zu ermöglichen. Die Abbildungen 3-14 und 3-15 zeigen die aktivitätsnormierten Daten der Herzfrequenz als Balkendiagramm.

Basismessung

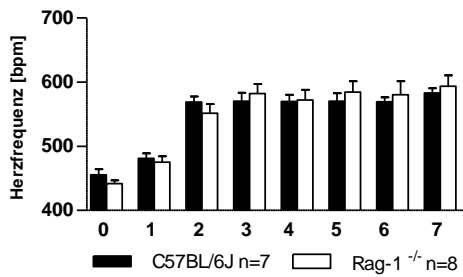


Abbildung 3-14: Balkendiagramm, Mittlere Herzfrequenz des jeweiligen Aktivitätsclusters im Gruppenvergleich während der Basismessung [Mittelwert +/- SEM]. Als Datenquelle dienen die pro Tier individuell ermittelten Aktivitätscluster Herzfrequenzwerte aus den 1-minütigen Messintervallen.

Ang-II

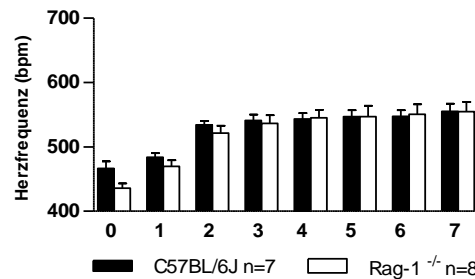


Abbildung 3-15: Balkendiagramm, Mittlere Herzfrequenz des jeweiligen Aktivitätsclusters im Gruppenvergleich während der Ang-II Infusion [Mittelwert +/- SEM]. Als Datenquelle dienen die pro Tier individuell ermittelten Aktivitätscluster Herzfrequenzwerte aus den 1-minütigen Messintervallen.

Beide Versuchsgruppen zeigen einen Anstieg der Herzfrequenz mit steigendem Aktivitätsniveau. Die Änderungsrate ist zwischen den ersten drei Aktivitätsclustern sehr hoch und nimmt dann ab. Zwar zeigen sich augenscheinlich geringe Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen innerhalb einiger Aktivitätscluster, jedoch treten mittels 1-Way-ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison Test keinerlei statistische Signifikanzen im Vergleich beider Gruppen auf. Die oben genannten statistisch signifikanten Abweichungen beider Gruppen hinsichtlich der Herzfrequenz scheinen sich somit durch die unterschiedlich starke körperliche Aktivität zu erklären.

3.6.3. Blutdruck

3.6.3.1. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Auf den Abbildungen 3-16 und 3-17 ist in den jeweiligen Gruppen der MAP-Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum als Nacht- bzw. Tag-Mittelwert dargestellt.

☾ 12h-Mittelwerte Nacht

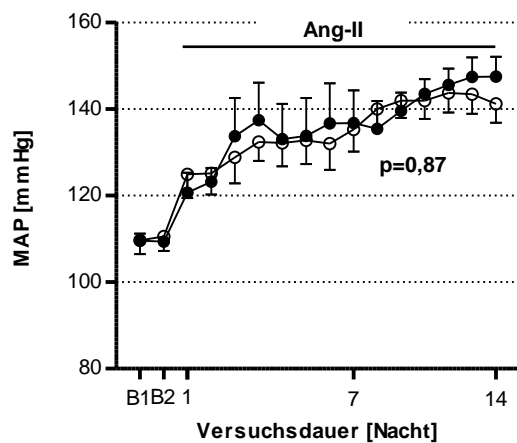


Abbildung 3-16: X-Y Diagramm, MAP als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM], die Datenpunkte B1 und B2 repräsentieren die Basismessung.

☀ 12h-Mittelwerte Tag

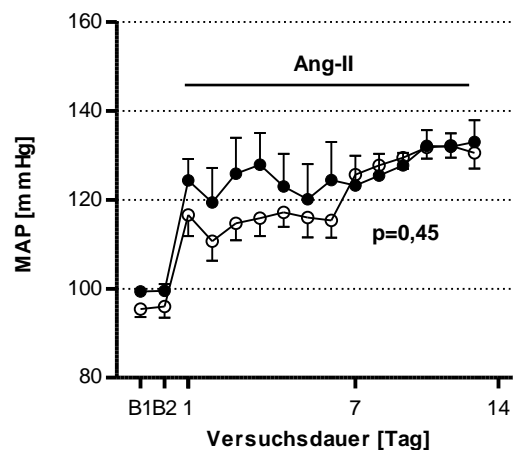


Abbildung 3-17: X-Y Diagramm, MAP als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage im Verlauf über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM], die Datenpunkte B1 und B2 repräsentieren die Basismessung.

Der mittlere arterielle Blutdruck ist unter Angiotensin-II Infusion sowohl während der Nachtstunden, als auch am Tage in beiden Versuchsgruppen im Verlaufe des Experiments angestiegen. Ab dem 7. Tag der Angiotensin-II Infusion stellt sich in beiden Gruppen ein relativ stabiles Druckniveau mit einem kleinen Standardfehler innerhalb der Versuchsgruppen ein. Eine 2-Way-ANOVA Testung und ein Bonferroni post-Test ergaben sowohl über die Nacht- als auch über die Tagstunden für beide Gruppen eine hochsignifikante Änderung des MAP über die Versuchszeit [$p < 0,001$], jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied des MAP im Gruppenvergleich [p -Wert: siehe Abbildungen]. Die Abbildungen 3-18 und 3-19 zeigen die Abweichung des MAP über die Dauer der Angiotensin-II Infusion gegenüber des während der Basismessung durchschnittlich gemessenen MAP.

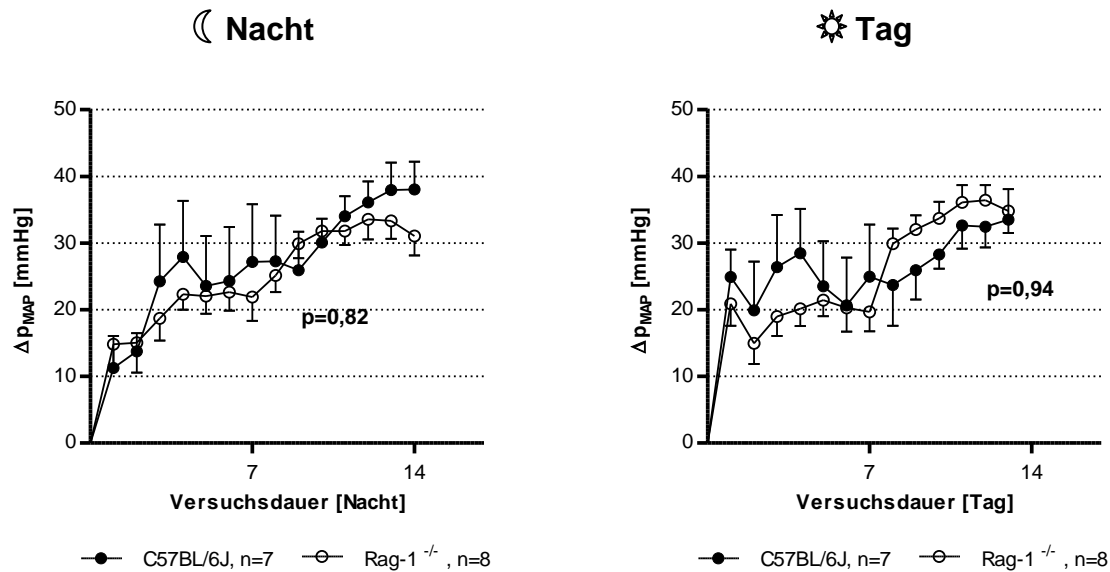
ΔBasis-Ang-II HF 12h-Mittelwerte

Abbildung 3-18: X-Y Diagramm, Gemittelte Abweichungen des MAP gegenüber Basismessung bei Nacht. Aus jedem Versuchstier wurde eine individuelle Abweichung des MAP zu jeweiligen Zeitpunkt berechnet und diese innerhalb der Gruppe erneut als 12h-Mittelwert dargestellt

Abbildung 3-19: X-Y Diagramm, Gemittelte Abweichungen des MAP gegenüber Basismessung am Tage. Aus jedem Versuchstier wurde eine individuelle Abweichung des MAP zu jeweiligen Zeitpunkt berechnet und diese innerhalb der Gruppe erneut als 12h-Mittelwert dargestellt.

Auch in diesen Darstellungen zeigt sich, dass der mittlere arterielle Blutdruck unter Angiotensin-II Infusion sowohl während der Nachtstunden als auch am Tage in beiden Versuchsgruppen im Verlauf des Experiments angestiegen ist. Ab dem 7. Tag der Angiotensin-II Infusion stellt sich in beiden Gruppen ein relativ stabiles Druckniveau mit einem kleinen Standardfehler innerhalb der Versuchsgruppen ein. Eine 2-Way-ANOVA Testung und ein Bonferroni post-Test ergaben sowohl über die Nacht- als auch über die Tagstunden für beide Gruppen eine hochsignifikante Änderung des MAPs über die Versuchszeit [$p < 0,001$], jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied des MAP im Gruppenvergleich [p -Wert: siehe Abbildungen]. Abbildung 3-20 verdeutlicht als Balkendiagramm die in den jeweiligen Teilzeiträumen herrschenden MAP Niveaus der Versuchsgruppen.

Arithmetische Mittelung des MAP

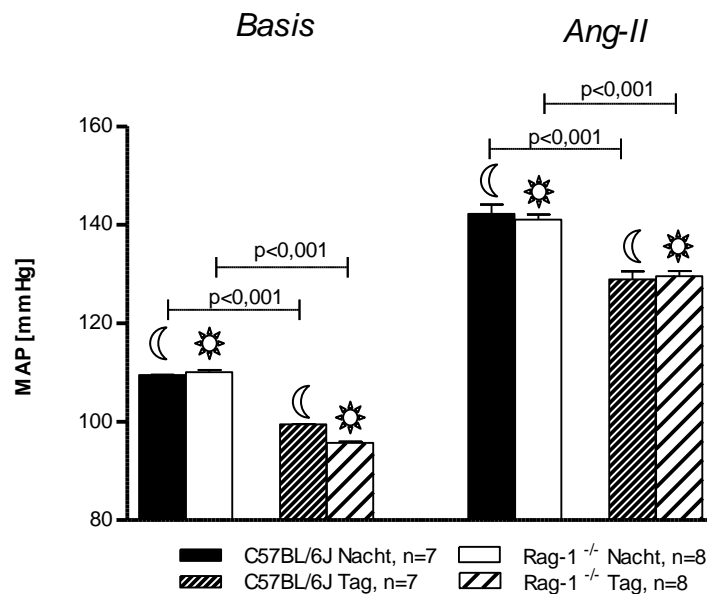


Abbildung 3-20: Balkendiagramm, Arithmetische 12h-Mittel des MAP [Mittelwerte \pm SEM]. Als Datenquellen dienen die Telemetriedaten der beiden Tage der Basismessung, bzw. der Tage 7-14 der Ang-II Infusion.

Aus den Daten kann gelesen werden, dass die verwendete Methodik der Angiotensin-II Infusion in beiden Gruppen einen deutlichen Anstieg des MAP-Niveaus sowohl am Tage [ca. +32mmHg] als auch bei Nacht [ca. +32,5mmHg] ausgelöst hat. Im Balkendiagramm wird ebenfalls der nahezu gleiche Anstieg des MAP dargestellt. Ein Newman-Keuls Multiple Comparison Test ergab bei beiden Gruppen statistisch hochsignifikante Unterschiede [$p < 0,001$] zwischen Tag und Nacht, was für eine vorhandene Tag-/Nacht-Rhythmik spricht, sowie zwischen Basismessung und Angiotensin-II Infusion, was für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie spricht. Zwischen beiden Versuchsgruppen treten jedoch mittels Newman-Keuls Multiple Comparison Test keine statistischen Signifikanzen auf. Tabelle 3-3 zeigt die annähernd gleiche relative Veränderung des Druckniveaus von der Basismessung zur Angiotensin-II Infusion in beiden Gruppen.

Genotyp	Basis [Tag+Nacht]	Ang-II [Tag+Nacht]	Relative Änderung gegenüber Basis
C57BL/6J	104,45 \pm 1,37 mmHg	135,22 \pm 4,92 mmHg	+ 30,49%
Rag-1 ^{-/-}	102,90 \pm 3,26 mmHg	134,27 \pm 4,37 mmHg	+ 29,46%

Tabelle 3-3: MAP-Niveau Veränderung bei Ang-II Infusion [Mittelwerte \pm SEM], Arithmetische Mittelung der beiden Tage der Basismessung und Tage 7-14 der Ang-II Infusion

Abbildung 3-21 zeigt den Verlauf des gemessenen MAP gemittelt über einen virtuellen Tag. Als Datenquellen dienen die 1h- Mittelwerte beider Tage der Basismessung und die 1h-Mittelwerte der letzten sieben Tage während Angiotensin-II Infusion.

Zirkadianer Verlauf des MAP, *Basismessung und Ang-II*

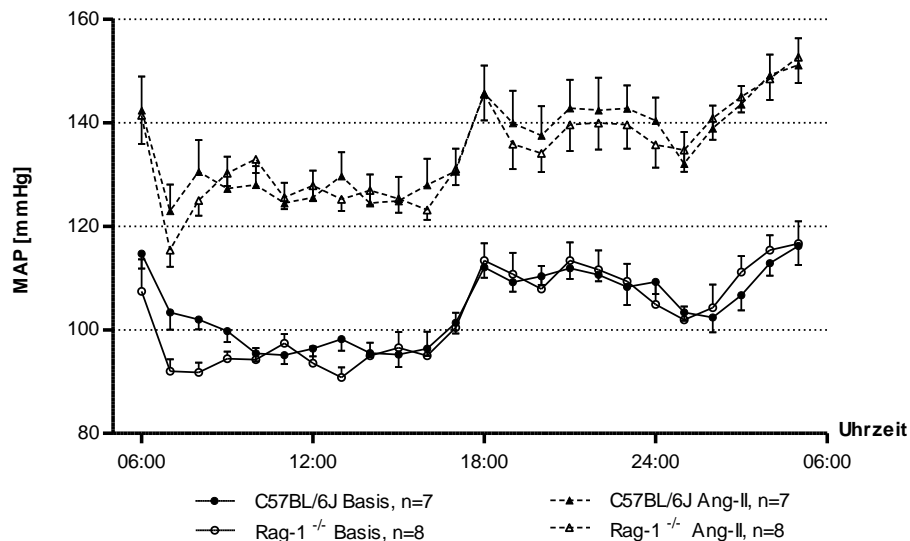


Abbildung 3-21: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf des MAP [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der 1h-Mittelwerte der beiden Tage der Basismessung, bzw. der Tage 7-14 der Ang-II Infusion.

Der zirkadiane Verlauf des mittleren arteriellen Druckes zeigt wie die körperliche Aktivität und die Herzfrequenz eine deutliche Tag-Nacht-Rhythmik. Sowohl während der Basismessung, als auch unter Ang-II Infusion bewegt sich der MAP während der Nachtstunden auf einem deutlich höheren Niveau als am Tage. Eine leichte Absenkung ist zwischen 24:00 und 02:00 erkennbar. Minimale Werte herrschen bei 10:00, maximale bei 06:00. Der größte ersichtliche Unterschied zwischen beiden Gruppen liegt in der Basismessung zwischen 07:00 und 09:00. Zu allen anderen Zeiten zeigen die Gruppen nahezu synchrone Verläufe. Eine 2-Way ANOVA Testung hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Genotypen fiel nicht signifikant aus. Über die Zeit ergab die Testung eine hochsignifikante Änderung des MAP in beiden Gruppen, sodass auch hier eine deutliche Dynamik über den Tagesverlauf feststellbar ist.

3.6.3.2. Korrelation der körperlichen Aktivität mit dem MAP

Der ähnliche Kurvenverlauf der körperlichen Aktivität, sowie des mittleren arteriellen Drucks lassen auf einen Zusammenhang beider Parameter schließen. Die folgenden Abbildungen beinhalten auf zwei Y-Achsen verteilt sowohl die körperliche Aktivität, als auch den zeitgleich ermittelten MAP.

Zirkadianer Verlauf, KA vs. MAP

Basismessung

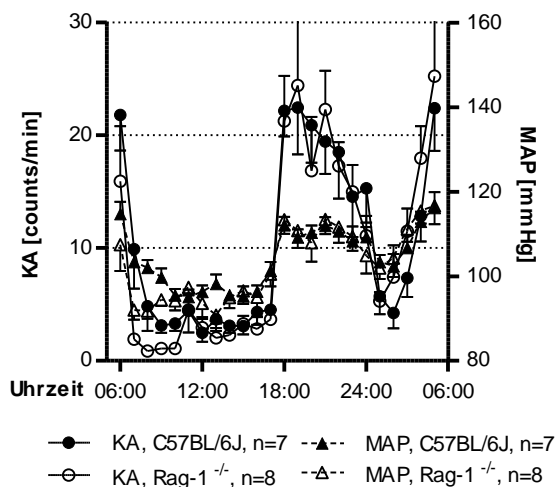


Abbildung 3-22: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. MAP im Gruppenvergleich während Basismessung [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der 1h-Mittelwerte der beiden Tage der Basismessung.

Ang-II

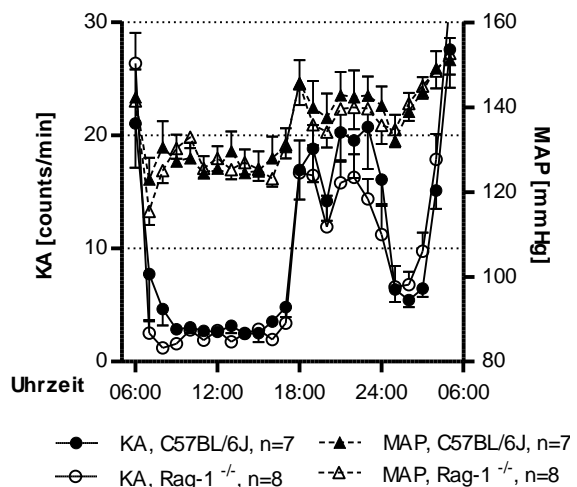


Abbildung 3-23: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. MAP im Gruppenvergleich während Ang-II Infusion [Mittelwerte +/- SEM]. Jeder Datenpunkt repräsentiert die arithmetische Mittelung der 1h-Mittelwerte der Tage 7-14 der Ang-II Infusion.

Es zeigt sich augenscheinlich eine deutliche Korrelation zwischen körperlicher Aktivität und mittlerem arteriellem Druck. In der tagsüber andauernden Ruhephase senkt sich in beiden Gruppen das MAP-Niveau deutlich gegenüber der nächtlichen Aktivitätsphase ab. Beide Versuchsgruppen reagieren gleichermaßen.

Auch während der Ang-II Infusion bleibt die Korrelation zwischen körperlicher Aktivität und MAP vorhanden. Der MAP verläuft auf einem höheren Grundniveau. Eine 2-Way-ANOVA Testung hinsichtlich etwaiger Gruppenunterschiede fällt nicht signifikant aus. Mögliche Aktivitätsunterschiede, die blutdruckbeeinflussend wirken, können demnach nicht festgestellt werden.

3.6.3.3. Aktivitätsnormierter MAP

Analog zur aktivitätsnormierten Auswertung der Herzfrequenz (siehe 3.3.2.1) zeigen die Abbildungen 3-24 und 3-25 den mittleren MAP im jeweiligen Aktivitätscluster.

Basismessung

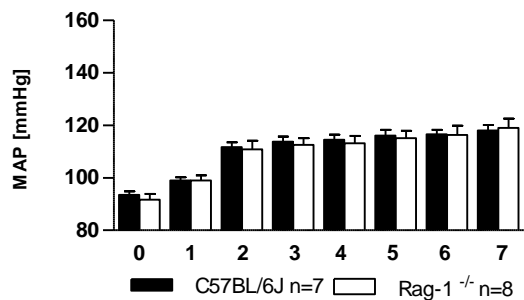


Abbildung 3-24: Balkendiagramm, Mittlerer MAP des jeweiligen Aktivitätsclusters im Gruppenvergleich während der Basismessung [Mittelwert +/- SEM]. Als Datenquelle dienen die pro Tier individuell ermittelten Aktivitätscluster MAP Werte der 1-minütigen Messintervalle.

Ang-II

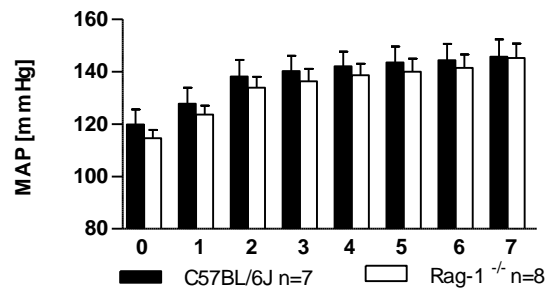


Abbildung 3-25: Balkendiagramm, Mittlerer MAP des jeweiligen Aktivitätsclusters im Gruppenvergleich während der Angiotensin-II Infusion [Mittelwert +/- SEM]. Als Datenquelle dienen die pro Tier individuell ermittelten Aktivitätscluster MAP Werte der 1-minütigen Messintervalle.

Beide Versuchsgruppen zeigen einen Anstieg des MAP mit steigendem Aktivitätsniveau. Die Änderungsrate ist zwischen den ersten drei Aktivitätsclustern sehr hoch und nimmt dann ab. Es zeigt sich, dass sich die Rag-1^{-/-} Mäuse in jedem Aktivitätscluster auf einem geringfügig höheren Niveau befinden. Kein Vergleich zwischen den Genotypen fällt jedoch statistisch signifikant aus. Auch nach der durchgeführten Aktivitätsnormierung zeigen beide Versuchsgruppen das gleiche Blutdruckverhalten.

3.6.3.4. Systolischer Blutdruck (P_{Sys})

Auf den Abbildungen 3-26 und 3-27 ist in den jeweiligen Gruppen der Verlauf des systolischen Blutdrucks über den gesamten Versuchszeitraum als Nacht- bzw. Tag-Mittelwert dargestellt.

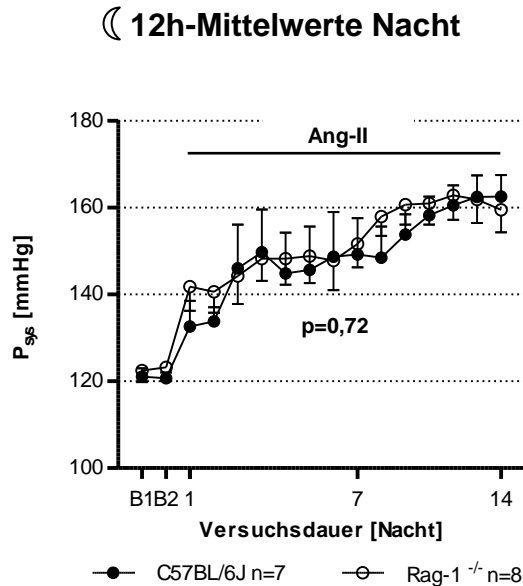


Abbildung 3-26: X-Y Diagramm, Systolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM]

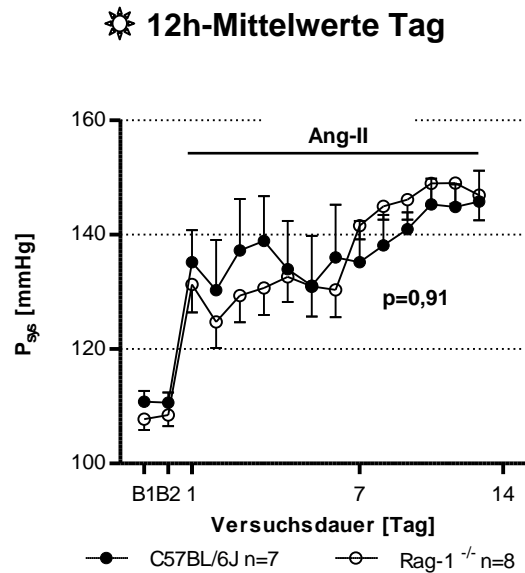


Abbildung 3-27: X-Y Diagramm, Systolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM]

Der systolische Blutdruck reagiert während der Angiotensin-II Infusion sowohl in den Nacht- als auch in den Tagstunden mit einer stetigen Erhöhung über die Versuchszeit. Gegen Ende der Versuchsdauer stellt sich ein stabiles Plateau mit einem geringen Standardfehler innerhalb der Gruppen ein. Zwischen Wildtypen und Rag-1^{-/-} sind zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede festzustellen (2-Way-ANOVA und Bonferroni post-Test, p-Werte siehe Diagramm).

3.6.3.5. Diastolischer Blutdruck (P_{Dia})

Auf den Abbildungen 3-28 und 3-29 ist in den jeweiligen Gruppen der Verlauf des diastolischen Blutdruckes über den gesamten Versuchszeitraum als Nacht- bzw. Tag-Mittelwert dargestellt.

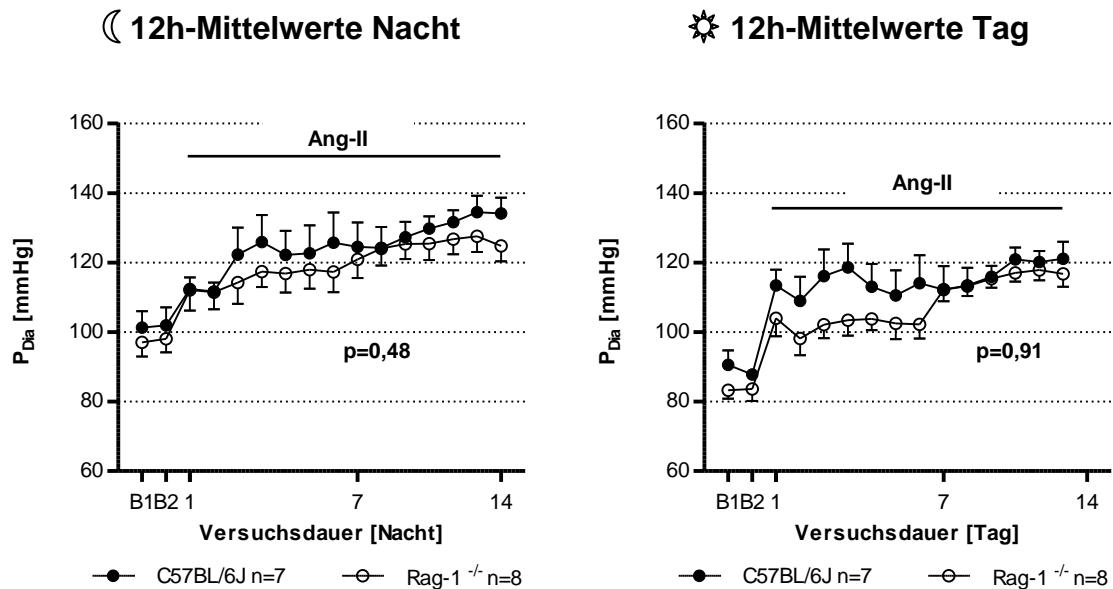


Abbildung 3-28: X-Y Diagramm, Diastolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM]

Abbildung 3-29: X-Y Diagramm, Diastolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage über die gesamte Versuchsdauer [Mittelwerte +/- SEM]

Der diastolische Blutdruck reagiert während der Angiotensin-II Infusion sowohl in den Nacht- als auch in den Tagstunden mit einer Erhöhung über die Versuchszeit. Gegen Ende der Versuchsdauer stellt sich in beiden Versuchsgruppen ein stabiles Plateau mit einem geringen Standardfehler innerhalb der Gruppen ein. Während der ersten 7 Versuchstage der Ang-II Infusion fällt besonders während der Tagstunden ein im Vergleich erhöhter diastolischer Blutdruck der Wildtypen gegenüber Rag-1^{-/-} auf. Der festgestellte Standardfehler ist während dieser Zeit jedoch als relativ hoch anzusehen. Ein Bonferroni post Test fiel zu keinem Zeitpunkt signifikant aus.

3.6.3.6. Blutdruckamplitude

Die folgende Abbildung zeigt die Änderung (ΔP) des diastolischen und systolischen Blutdrucks im Gruppenvergleich von der Basismessung zur Angiotensin-II Infusion.

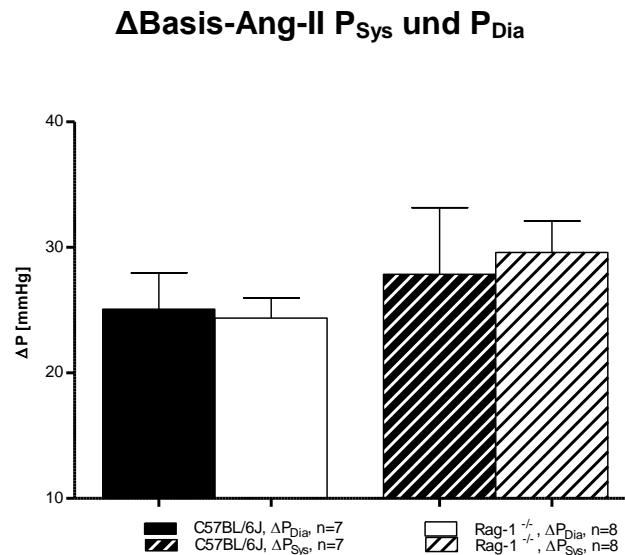


Abbildung 3-30: Balkendiagramm, Änderung (ΔP_{Sys} & ΔP_{Dia}) von Basismessung zur Ang-II Infusion. Bei der Berechnung wurde für jedes Versuchstier zunächst die individuelle Abweichung bestimmt, welche dann innerhalb der Versuchsgruppen arithmetisch gemittelt wurden [Mittelwerte \pm SEM].

Beide Gruppen zeigen eine identische Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdruckniveaus unter Ang-II Infusion. Die statistische Testung mittels Newman-Keuls Multiple Comparison Test fiel jedoch nicht signifikant aus. Aus dieser Darstellung kann entnommen werden, dass die Blutdruckamplitude in beiden Versuchsgruppen gleich stark angestiegen ist.

3.7. Endorganschäden

3.7.1. Aorta

3.7.1.1. Gefäßfunktion

Die Abbildungen 3-31 und 3-32 zeigen die Rohdaten der im Myographen bestimmten Relaxationsfähigkeit der Aortenringe. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Mittelung von den jeweiligen Mittelwerten aus je zwei gemessenen Aortenringen eines Versuchstieres derselben Versuchsgruppe. Abbildung 3-31 zeigt die Relaxationsfähigkeit bei steigender Konzentration von Acetylcholin, Abbildung 3-32 bei steigender Konzentration von Nitroglycerin im Organbad. Die Aorten von n=2 Tieren pro Gruppe konnten aufgrund organisatorischer Gründe nicht durchgeführt werden.

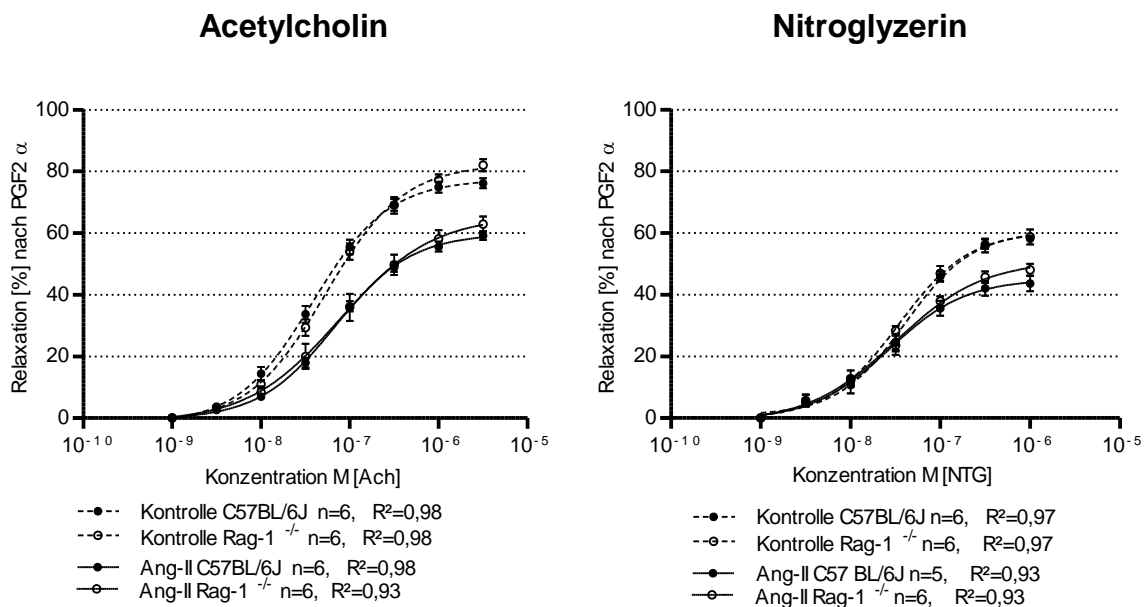


Abbildung 3-31: Hill-Kurve, Reaktion der Aortenringe auf Acetylcholin im Myographen [Mittelwert +/- SEM, Regression mit Hillkurve]. Pro Tier wurden jeweils zwei Aortenringe gemessen und ein individueller Mittelwert gebildet. Die individuellen Mittelwerte sind die Grundlage für die erzeugten gemittelten Datenpunkte im Diagramm.

Abbildung 3-32: Hill-Kurve, Reaktion der Aortenringe auf Nitroglycerin im Myographen [Mittelwert +/- SEM, Regression mit Hillkurve]. Pro Tier wurden jeweils zwei Aortenringe gemessen und ein individueller Mittelwert gebildet. Die individuellen Mittelwerte sind die Grundlage für die erzeugten gemittelten Datenpunkte im Diagramm.

Die endothelabhängige Vasorelaxation durch Acetylcholingabe in das Organbad zeigt bei steigender Wirkstoffkonzentration einen sigmoiden Verlauf. In der Darstellung wurde eine Hill-Kurve an die erhobenen Messpunkte angenähert [R² = 0,93-0,98]. Beide mit Ang-II behandelten Gruppen zeigen im Vergleich zu den unbehandelten, Genotyp-identischen Kontrollgruppen, ein augenscheinlich geringeres Maximum, was einer gestörten Relaxationsfähigkeit entspricht. Angiotensin-II

scheint hier die Gefäßfunktion beider Versuchsgruppen gleichermaßen negativ beeinträchtigt zu haben.

Die endothelunabhängige Vasorelaxation durch Nitroglyzeringabe zeigt bei steigender Wirkstoffkonzentration ebenfalls einen sigmoiden Verlauf. In der Darstellung wurde eine Hill-Kurve an die erhobenen Messpunkte angenähert [$R^2 = 0,93-0,97$]. Auch hier zeigen beide mit Ang-II behandelten Gruppen im Vergleich zu den unbehandelten, Genotyp-identischen Kontrollgruppen, ein augenscheinlich geringeres Maximum, was einer gestörten Relaxationsfähigkeit entspricht. Angiotensin-II scheint auch hier die Gefäßfunktion beider Versuchsgruppen gleichermaßen negativ beeinträchtigt zu haben. Die Balkendiagramme in der folgenden Darstellung zeigen die berechneten Parameter der Hillkurven im Vergleich zwischen den Genotypen sowie Kontroll- versus Ang-II Gruppe. Auch hier wurden die Mittelwerte der aus jeweils zwei Aortenringen pro Tier ermittelten Daten verwendet. Die pro Tier erhobenen Mittelwerte wurden wiederum in Versuchsgruppen gruppiert gemittelt und im Diagramm aufgetragen. Das Maximum entspricht dabei der maximal möglichen Relaxation unter der Höchstdosis des jeweiligen Agens im Organbad. Die Steigung (Slope bzw. Hill Koeffizient) beschreibt die Anstiegssteilheit der Sigmoidfunktion im Wendepunkt. Je höher die Steigung, desto enger ist der Dosisbereich in dem das Gefäß auf das Agens reagiert und desto prompter erfolgt die Relaxation. Je niedriger die Steigung, desto träger reagiert das Gefäß mit einer Relaxation. Der Logarithmus der Effektiven Dosis 50 zur Basis 10 [LogEC_{50}] beschreibt in mathematisch vereinfachter Form die Konzentration der effektiven Agensdosis, die nötig ist, um 50% der maximal möglichen Relaxation [100%] zu erreichen. Je niedriger die LogEC_{50} , desto empfindlicher reagiert das Gefäß auf das jeweilige Agens.

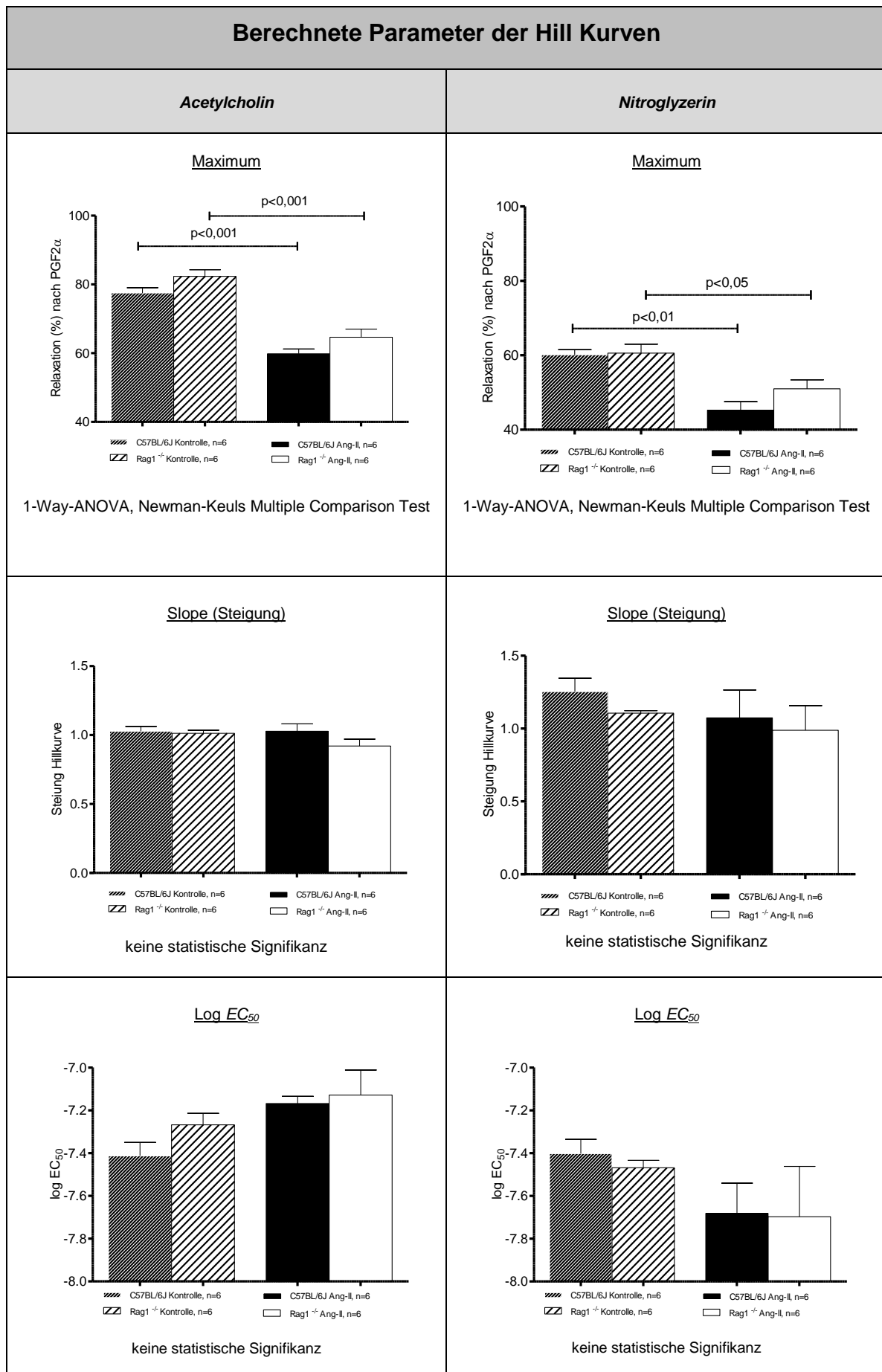


Abbildung 3-33: Berechnete Parameter der Hill Kurven

Die Aortenringe der mit Ang-II behandelten Tiere zeigen für beide Genotypen in der maximal eingesetzten Acetylcholin-Konzentration eine mittels Newman-Keuls Multiple Comparison Test hochsignifikant niedrigere maximale Relaxation als die unbehandelten Tiere der Kontrollgruppen. Rag-1^{-/-} Mäuse erreichen sowohl unter Acetylcholin als auch unter Nitroglyzerin eine leicht höhere Relaxation. Der beschriebene Unterschied ist jedoch mit gleicher Testung statistisch nicht signifikant. Die Steigung und die Log EC₅₀ zeigen zwar augenscheinlich leichte Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, weisen jedoch im Newman-Keuls Multiple Comparison Test keine statistischen Signifikanzen auf.

3.7.1.2. Histopathologie

Abbildung 3-34 zeigt die mikroskopisch bestimmte Fläche der Lamina mediae aortae thoracicae im Vergleich zwischen unbehandelten Kontrolltieren und den mit Angiotensin-II behandelten Versuchsgruppen sowie im Vergleich zwischen beiden Genotypen.

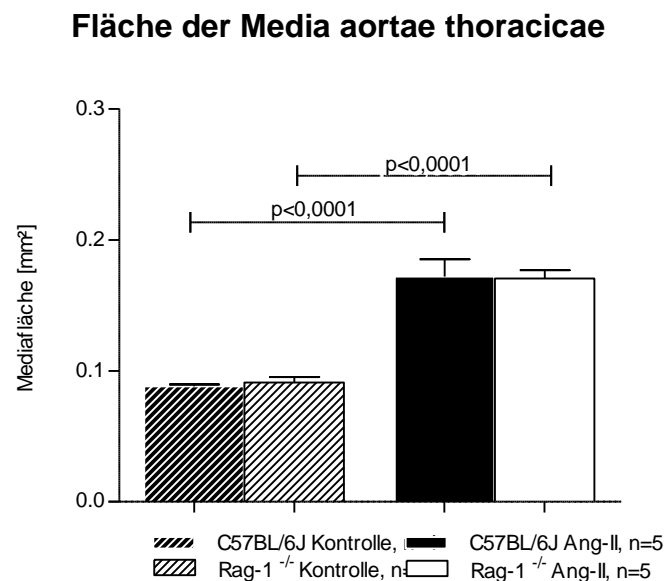


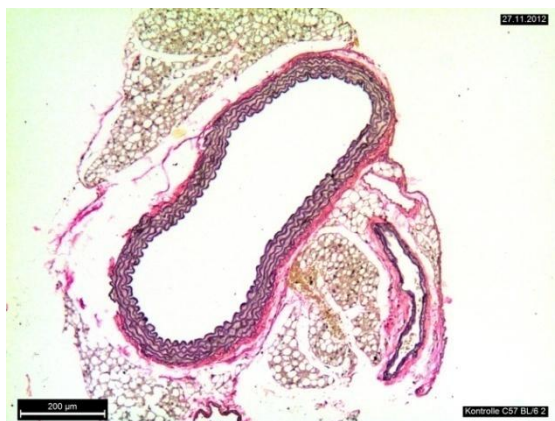
Abbildung 3-34: Balkendiagramm, Mediafläche der Aorta [Mittelwert +/- SEM]

Die Fläche der Media aortae stellt sich nach Ang-II Infusion deutlich hypertrophiert dar. Die Mediafläche der mit Angiotensin-II behandelten Wildtypen [0,172±0,03mm] ist gegenüber der Genotyp-identischen Kontrollgruppe [0,088±0,002mm] deutlich vergrößert. Ähnlich verhält sich der Unterschied zwischen der mit Angiotensin-II behandelten Rag-1^{-/-} Versuchsgruppe [0,170±0,006mm] mit deren ebenfalls Genotyp-identischer Kontrollgruppe [0,091±0,006mm]. Ein durchgeführter Newman-Keuls Multiple Comparison Test

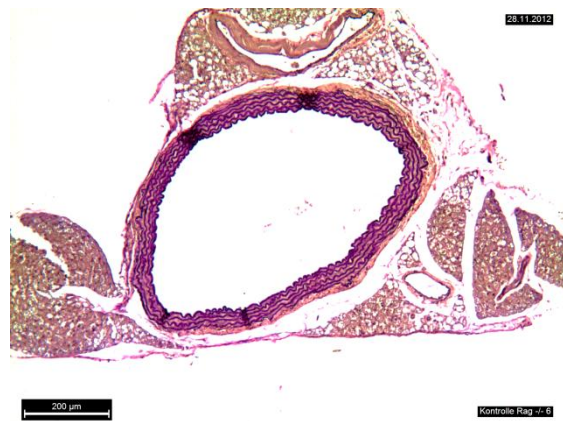
zeigt bei beiden Genotypen eine statistisch hochsignifikante Abweichung zwischen der Mediafläche der unbehandelten Kontrolltiere und der Mediafläche der mit Angiotensin-II behandelten Tiere. Im Vergleich zwischen beiden Genotypen finden sich bezüglich der Mediafläche bereits augenscheinlich weder zwischen den Kontrollgruppen, noch zwischen den Versuchsgruppen etwaige Unterschiede. Ein Newman-Keuls Multiple Comparison Test fiel auch hier statistisch nicht signifikant aus. Pro Versuchsgruppe mussten $n=3$ Aortenpräparate von der Auswertung ausgeschlossen werden, da diese bei der histologischen Aufbereitung ihre histologische Integrität verloren haben (Riss oder Zerquetschung des Gefäßes).

Histologische Schnitte der Aorta thoracica

Kontrollgruppe, C57BL/6J



Kontrollgruppe, Rag-1^{-/-}



Ang-II, C57BL/6J



Ang-II, Rag-1^{-/-}



Abbildung 3-35: Histologie Aorta, Repräsentativer Vergleich zwischen den Experimentalgruppen

3.7.2. Herz

3.7.2.1. Gewicht

Abbildung 3-36 zeigt im Balkendiagramm das Verhältnis aus Herzventrikelgewicht zum Körpergewicht als Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppen im Vergleich zwischen Behandlung und Genotyp. Die Abbildung 3-37 zeigt die Differenz der mit Angiotensin-II behandelten Versuchsgruppe zur jeweils Genotyp-identischen Kontrollgruppe.

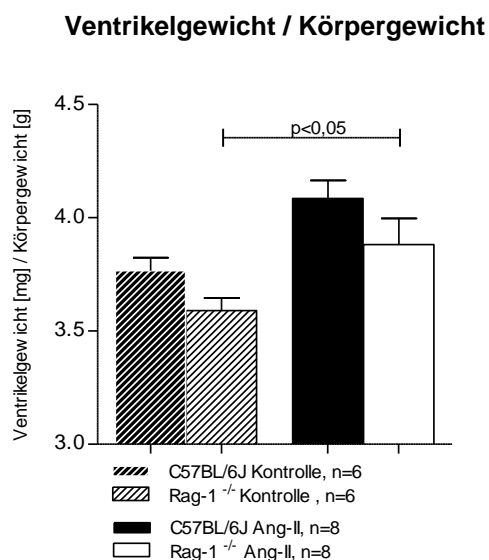


Abbildung 3-36: Balkendiagramm, Ratio: Ventrikelgewicht / Körpergewicht [Mittelwert +/- SEM], Newman-Keuls Multiple Comparison Test

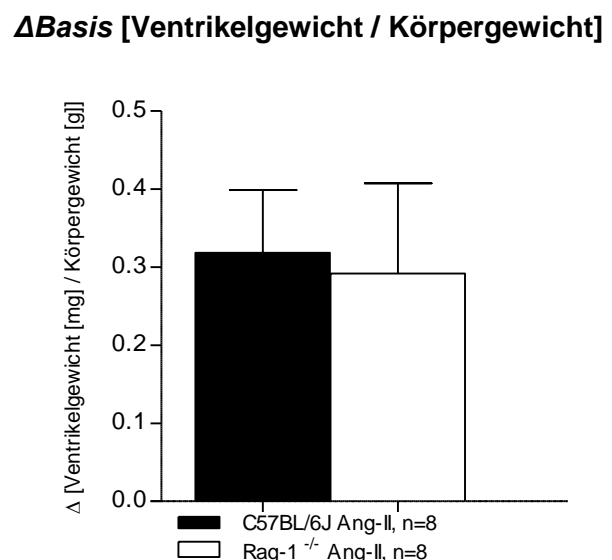


Abbildung 3-37: Balkendiagramm, Δ Ratio: Ventrikelgewicht / Körpergewicht [Mittelwert +/- SEM]. Beide Balken entsprechen der Differenz zwischen der behandelten Versuchsgruppe mit der jeweils Genotyp-identischen unbehandelten Kontrollgruppe.

Zwischen den Kontrollgruppen zeigt sich eine augenscheinliche, jedoch im Newman-Keuls Multiple Comparison Test statistisch nicht signifikante Tendenz für ein höheres Ventrikelgewicht bei den unbehandelten C57BL/6J Mäusen [$3,77 \pm 0,06$ mg/g] verglichen mit den ebenfalls unbehandelten Rag-1^{-/-} Mäusen [$3,59 \pm 0,06$ mg/g]. Nach Angiotensin-II Einfluss ist das Ventrikelgewicht beider Genotypen gegenüber den Kontrollgruppen deutlich erhöht. In beiden mit Ang-II behandelten Versuchsgruppen ist das Verhältnis aus Ventrikelgewicht und Körpergewicht um etwa +0,3 mg/g höher als in der unbehandelten Genotyp-identischen Kontrollgruppe [Wildtypen: +0,32 mg/g; Rag-1^{-/-}: +0,29 mg/g]. Somit ist von einer gleich starken Myokardhypertrophie durch Ang-II Infusion beider Genotypen aus-

zugehen. Die Tendenz für ein höheres Ventrikelgewicht bei C57BL/6J Mäusen [$4,09 \pm 0,08 \text{ mg/g}$] gegenüber Rag-1^{-/-} Mäusen [$3,88 \pm 0,12 \text{ mg/g}$] bleibt erhalten.

Somit kann auf eine hinsichtlich des Ventrikelgewichtes gleich starke Myokardhypertrophie beider Genotypen unter dem Einfluss von Angiotensin-II geschlossen werden.

3.7.2.2. Histopathologie

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis des Fibrosegrades des Myokards der jeweiligen Versuchsgruppen als PSR-Score:

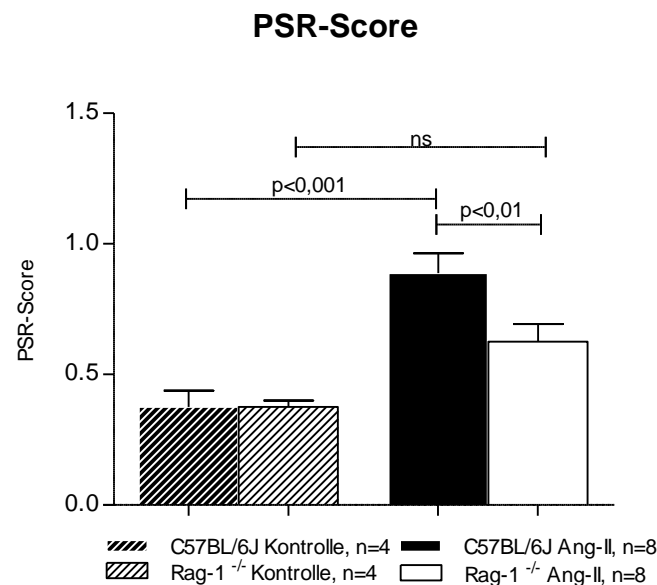


Abbildung 3-38: Balkendiagramm, PSR Score [Mittelwert +/- SEM]

Der PSR-Score beider unbehandelten Kontrollgruppen ist mit $0,38 \pm 0,06$ bei Wildtypen und $0,38 \pm 0,03$ identisch. Im Vergleich zwischen den Genotypen innerhalb der mit Angiotensin-II behandelten Tiere erhielten die Herzen der Wildtypen einen mit $0,89 \pm 0,08$ deutlich höheren durchschnittlichen PSR-Score als die Rag-1^{-/-} Mäuse mit $0,63 \pm 0,07$. In beiden Genotypen ist der Kollagenanteil im Myokard nach Angiotensin-II Behandlung gegenüber den Genotyp-identischen Kontrollgruppen erhöht. Bei Rag-1^{-/-} Mäusen mittels Newman-Keuls Multiple Comparison Test jedoch statistisch nicht signifikant. Die mit Angiotensin-II behandelten Tiere der Wildtypen weisen gegenüber den ebenfalls behandelten Rag-1^{-/-} Mutanten einen statistisch signifikant höheren PSR-Score auf (Newman-Keuls Multiple Comparison Test). So zeigte der Rag-1^{-/-} Genotyp einen protektiven Effekt für die Entwicklung einer Myokardfibroseentwicklung durch Angiotensin-II.

4. Diskussion

4.1. Methodikdiskussion

4.1.1. Genotyp und Phänotyp

Die vor Versuchsbeginn und nach der Organentnahme wiederholt durchgeführte Genotypisierung ergab bei allen Mäusen der Studie den erwarteten Genotyp. Fehlerhafte Genotypisierungen gelten als sehr unwahrscheinlich, Verwechslungen sind praktisch ausgeschlossen. Die FACS-Analyse zeigte im Blut der Rag-1^{-/-} Mutanten im Gegensatz zu C57BL/6J Wildtypen keine T-Lymphozyten. Der fehlende Nachweis reifer T-Lymphozyten im Blut spiegelt den typischen Phänotyp der Rag-1^{-/-} Mutante wider.

4.1.2. Verwendete Mauslinien und deren Haltung

Die verwendeten Mauslinien (C57BL/6J und Rag1tm1Mom) sind seit vielen Jahren etablierte Linien für Forschungszwecke im Rahmen physiologischer und immunologischer Studien [The Jackson Laboratory. 10.05.2015; Mombaerts, et al. 1992]. Im Institut, in dem die Studien für diese Arbeit durchgeführt worden sind, wurde die Haltung der Rag-1^{-/-} Mäuse für diese Studie etabliert. Aufgrund des Immundefekts dieser Mauslinie wurde stets auf höchste Reinlichkeit im Umgang und in der Haltung aller an der Studie beteiligten Tiere beider Genotypen geachtet. Zugeführte Luft wurde nach einem etablierten System durch zwei Filtersysteme möglichst keimfrei gehalten. Trotz aller Maßnahmen kann ein Kontakt mit Pathogenen nie gänzlich ausgeschlossen werden. Es ergibt sich grundsätzlich eine bedingt beherrschbare Fehlerquelle der Empfänglichkeit besonders für virale Infektionen von Rag-1^{-/-} Mäusen, da gerade für deren Abwehr ein intaktes adaptives Immunsystem notwendig ist [Koyama, et al. 2008; Takeuchi und Akira 2009]. Virale Infektionen können sowohl erhöhend, als auch erniedrigend auf den Blutdruck wirken. Cheng et. al konnten im Mausmodell zeigen, dass die Infektion mit dem weit verbreiteten Cytomegalievirus zu einer Blutdruckerhöhung führt [Cheng, et al. 2009]. Eine Reduktion im Blut zirkulierender neutrophiler Granulozyten, z.B. im Rahmen einer Virusinfektion, kann eine arterielle Hypotonie auslösen [Morton, et al. 2008]. Solche Konstellationen wurden bei Rag-1^{-/-} Mäusen jedoch bisher nicht beschrieben. In den durchgeführten Studien ist zu keinem Zeitpunkt eine äußerlich feststellbare Infektion oder ein krankhaftes Verhalten aufgetreten. Der auch zu diesem Zweck

regelmäßig kontrollierte Verlauf des Körpergewichtes war bei allen Mäusen stets konstant bis zunehmend. Sollte sich tatsächlich ein Verdacht auf eine Infektion ergeben, könnte die Konzentration von Akut-Phase-Proteinen wie z.B. das C-reaktive Protein oder Procalcitonin bestimmt werden, um Infektionen aufzudecken.

Der Blutdruck unterliegt auch Schwankungen durch die Aufnahme von Natrium durch das Futter. Eine hohe Zufuhr von Natrium durch das Futter und/oder Trinkwasser kann zu einer Erhöhung des Blutdrucks in Mäusen führen [Van Huysse, James W, et al. 2011]. Der Natriumgehalt des verwendeten Futters ist mit 3,0g/kg angegeben. Als Trinkwasser wurde allen an der Studie beteiligten Tieren autoklaviertes Leitungswasser der Hamburger Wasserwerke angeboten. Es existieren bisher keine Daten zur Abhängigkeit des Blutdruckes der Rag-1^{-/-} Mäuse unter verschieden hoher Kochsalzaufnahme. In Voruntersuchungen bezüglich des Blutdrucks an diesen Mäusen wurde auf eine detaillierte Angabe zur Diät verzichtet. Da alle Tiere beider Genotypen die gleiche Nahrung und gleiches Trinkwasser erhielten, sind hierdurch keine unterschiedlichen Wirkungen zwischen den Gruppen zu erwarten.

4.1.3. Telemetrie

Die telemetrischen Daten des Senders einer C57BL/6J Maus wurden verworfen, da Druckwerte unterhalb der lebensfähigen Grenze gemessen wurden und die Druckpulskurve nicht dem hinreichend erwarteten Verlauf entsprach. Alle anderen Telemetriedaten sind als qualitativ hochwertig angesehen worden, da die Druckpulskurven dem zu erwartenden Verlauf bezüglich Amplitude, Tag-Nacht Rhythmik bei nur einer geringen Anzahl an Artefakten entsprachen und somit in die Auswertung einfließen konnten. Der absolute Blutdruck und die Herzfrequenz im Verlauf der zirkadianen Rhythmik während der Basismessung entsprechen vorangegangenen Studien, welche mit gleicher telemetrischer Technologie den zirkadianen hämodynamischen Rhythmus un behandelter C57BL/6J Mäuse untersuchten [Li, et al. 1999]. Thrombogene Vegetationen oder mikrobielle Besiedlung an der Katheterspitze könnten generell die Messungen beeinflusst haben. Nach der Bergung des Senders und Katheters am Versuchsende wurden jedoch keine bemerkenswerten Vegetationen festgestellt. Auch eine Dislokation gilt als unwahrscheinlich, da die Messkatheter mit Gewebekleber benetzter Fäden fest am punktierten Gefäß fixiert worden sind und bei Entnahme keine Dislokationen detektiert werden konnten.

4.1.4. Erzeugung arterieller Hypertonie durch Angiotensin-II Infusion

Bei allen Tieren konnte unter Angiotensin-II Infusion ein statistisch signifikanter Blutdruckanstieg um etwa 30% gegenüber Basisbedingungen gemessen werden. Das verwendete Modell ist ein mehrfach etabliertes System zur Induktion einer arteriellen Hypertonie und Steigerung der Plasma Angiotensin-II Konzentration [Tsukamoto, et al. 2013]. Die Förderrate der osmotischen Pumpen wird vom Hersteller mit einer hohen Genauigkeit angegeben. Trotzdem wäre es prinzipiell möglich, dass es zu nicht kontrollierbaren Schwankungen der festgelegten Angiotensin-II Dosis gekommen ist und dadurch die Ergebnisse beeinflusst wurden. Die Pumpen wurden genau nach Herstellerangaben befüllt und verwendet. Interindividuelle und intraindividuelle Schwankungen des Körpergewichts führen ebenfalls zu einer minimal ungleich verteilten interindividuellen Dosierung des Angiotensin-II. Zwischen beiden Genotypen sind zu keinem Zeitpunkt eklatante Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichtes aufgetreten. Die Rag-1^{-/-} Mutanten wiesen zu Beginn der Ang-II Infusion im Mittel ein ca. 4% höheres Körpergewicht als die Mäuse der Wildtyp-Gruppe auf. Durch sorgfältige Anpassung der Dosis an das jeweilige Mausgewicht kann aber auch an dieser Stelle die richtige Dosierung des Ang-II sichergestellt werden. Die minimal schwereren Rag-1^{-/-} Mäuse würden, wenn überhaupt, eine geringfügig niedrigere Dosierung pro Körpergewicht erhalten haben als die Wildtypen, was sich eher in einem niedrigeren Blutdruck wiedergefunden hätte. Große Blutdruckunterschiede wären dadurch jedoch nicht zu erklären. Zur genauen Analyse hätte eine Angiotensin-II Konzentrationsbestimmung im Blut stattfinden können. Da der Einsatz der osmotischen Pumpen als etabliert und sicher gilt, wurde darauf verzichtet.

4.1.5. Histologische Untersuchungen

4.1.5.1. PSR-Score

Der PSR-Score ist ein selbst entwickeltes Verfahren zur Quantifizierung der Fibrose im Myokard. Die Retest-Reliabilität durch mehrere Scorer hat sich als sehr gut erwiesen. Alle Scorer kamen verblindet zu gleichen Ergebnissen, aber trotzdem handelt es sich um ein subjektives Verfahren.

4.1.5.2. Mediafläche der Aorta

Die Messung der Mediafläche der Aorta erfolgte standardisiert und verblindet. Jeweils n=3 histologische Präparate konnten pro Gruppe nicht ausgewertet werden, da es bei der histologischen Aufbereitung der Proben zu einer Ruptur des Gefä-

ßes kam. In anderen Arbeiten wurde zusätzlich zur Mediafläche die Mediadicke bestimmt [Guzik, et al. 2007]. Da hierbei aber keine unterschiedlichen Aussagen als bei der Bestimmung der Mediafläche gemacht werden konnten, haben wir darauf verzichtet.

4.2. Ergebnisdiskussion

4.2.1. Körperliche Aktivität

Rag-1^{-/-} Mutanten weisen über die gesamten Tagesstunden gemittelt eine statistisch signifikant geringere Aktivität als Wildtypen auf. Im zirkadianen Verlauf zeigt sich dieser Unterschied jedoch deutlich geringer und ist statistisch nicht signifikant. Laut Züchterangaben und Literatur ist eine Auffälligkeit hinsichtlich einer verminderten Aktivität bei Rag-1^{-/-} Mäusen nicht bekannt [The Jackson Laboratory. 10.05.2015]. Nach Implantation der osmotischen Pumpe weisen alle Tiere unabhängig vom Genotyp eine stark erniedrigte Aktivität auf. Die starke Abnahme ist am ehesten auf die Belastung der Maus durch die Operation zurück zu führen und weniger auf die Substanz Ang-II selbst. Am 3. postoperativen Tag stieg die körperliche Aktivität wieder auf präoperative Werte. Die Behandlung mit Angiotensin-II veränderte das Aktivitätsverhalten statistisch nicht signifikant. In der Tendenz ist die körperliche Aktivität gegenüber Basis bei beiden Genotypen sowohl tags als auch nachts gesunken, was durch eine leichte Beeinträchtigung durch die Angiotensin-II Wirkung zu erklären sein könnte. Im Tagesverlauf ist der typische Tag- / Nachtrhythmus der Mäuse weiterhin erkennbar. Der nächtliche Verlauf ist durch eine ca. 3 stündige Ruhephase geprägt. Auch dieses Verhalten entspricht Vorbeschreibungen [Li, et al. 1999].

4.2.2. Herzfrequenz

Es zeigt sich, dass generell die Herzfrequenz der Rag-1^{-/-} Mäuse geringer ist als die der C57BL/6J Wildtypen. Im Vergleich der 12h-Mittelwerte der Tagstunden zeigt sich dieser Unterschied statistisch signifikant. Er ist nach der aktivitätsnormierten Auswertung durch unterschiedlich ausgeprägte körperliche Aktivität und damit verbundene unterschiedliche Sympathikusaktivierung zu erklären. Das heißt bei gleicher Aktivität bieten beide Genotypen die gleiche Herzfrequenz. Während der Angiotensin-II Infusion zeigt sich in beiden Versuchsgruppen direkt nach der Implantation der osmotischen Minipumpe eine im Vergleich zur Basismessung geringere Herzfrequenz während der Nachtstunden. Dieser Befund kann durch

eine geringere körperliche Aktivität aufgrund einer vorübergehenden körperlichen Beeinträchtigung der Mäuse nach der Operation erklärt werden. Weiterhin wird durch die Narkose der natürliche Tag- /Nacht rhythmus der Mäuse gestört, sodass auch hier möglicherweise kurzzeitige Verhaltensauffälligkeiten auftreten können und sich eine reduzierte körperliche Aktivität in einer konsekutiv einhergehenden verminderten Herzfrequenz niederschlägt. In der akuten Phase der Ang-II Infusion könnte auch eine verminderte Sympathikusaktivierung zu den beobachteten Effekten führen. So führt die durch Ang-II ausgelöste Blutdruckerhöhung über Pressorezeptoren im Sinus caroticus zu einer Inhibierung sympathischer Neurone in der Medulla Oblongata mit folgender Dämpfung der noradrenergen Wirkung am Sinusknoten und konsekutiv negativer Chronotropie (siehe 1.1.2.1. Pressorezeptorenreflex).

Im Verlauf der Ang-II Infusion steigt die durchschnittliche Herzfrequenz der Mäuse in beiden Versuchsgruppen zusammen mit der körperlichen Aktivität wieder an und bleibt auf einem etwa gleichbleibenden Niveau, jedoch etwas unterhalb der durchschnittlichen Herzfrequenz während der Basismessung. Im Vergleich der Versuchstiere beider Genotypen reagieren diese auf Angiotensin-II identisch. T-Lymphozyten haben in unserem Versuch keinerlei direkte Auswirkung auf die Herzfrequenz bei einer durch Angiotensin-II ausgelösten arteriellen Hypertonie. Eine klinische Studie von Hartaigh et al. konnte eine positive Korrelation zwischen systemischer Inflammation, erhöhter Ruheherzfrequenz und kardiovaskulärer Mortalität zeigen [O Hartaigh, et al. 2013], jedoch existieren bisher keine experimentellen Daten um mögliche Kausalketten in diesem Zusammenhang zu erforschen.

4.2.3. Blutdruck & Gefäßschäden

4.2.3.1. Überblick

Das in dieser Arbeit genutzte etablierte Mausmodell zur Induktion einer arteriellen Hypertonie mit einer subkutanen Angiotensin-II Infusion [Guzik, et al. 2007; Wu, et al. 2014; Harrison, et al. 2011; Marvar, et al. 2010; Liu, et al. 2003] wurde mittels radiotelemetrischer Blutdruckerfassung genau analysiert. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Rag-1^{-/-} Mutanten im 14-tägigen Frühstadium der Hypertonie keine Unterschiede im Verlauf des Blutdrucks gegenüber Wildtypen zeigen. Unsere Daten spiegeln, ähnlich zu den Studien von Guzik und Wu, einen Anstieg des mittleren arteriellen Drucks bei Wildtypen während Angiotensin-II Infusion gegenüber der Basismessung um etwa 30% wider. Diese Feststellung ist demnach bei der in

dieser Arbeit ebenfalls genutzten Dosis von 490 ng/kg[MG]/h Angiotensin-II reproduzierbar. Eine Abschwächung der arteriellen Hypertonie konnten wir in Rag-1^{-/-} Mutanten jedoch nicht feststellen. Wildtypen und Rag-1^{-/-} unterscheiden sich in unseren Experimenten nicht hinsichtlich deren Blutdruckverhalten. Im Folgenden soll diese Ergebnisdiskrepanz diskutiert werden.

4.2.3.2. Superoxid Theorie, Lymphozytäre NADPH Oxidase und Neoantigenformierung

Wie in der Einleitung bereits beschrieben besteht eine Korrelation zwischen vaskulär konzentrierten ROS und arterieller Hypertonie. Bislang konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen ROS Bildung durch Angiotensin-II und der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in vivo existiert. Zwar konnte eine Reihe von Studien zeigen, dass die intravenöse oder die orale Gabe von Tempol, einem Superoxidfänger [Wilcox und Pearlman 2008], eine arterielle Hypertonie abmildert. Ob dies jedoch im Modell einer durch Angiotensin-II induzierten Hypertonie in vorher gesunden Versuchstieren der Fall ist, gilt als nicht eindeutig. So konnten Elmarakby et al. in Ratten die vaskuläre Superoxidproduktion bei Ang-II induzierter Hypertonie durch Gabe von Tempol nachweislich reduzieren, ohne jedoch dadurch Effekte auf den Blutdruck nachzuweisen. Eine Abschwächung der Hypertonie konnte erst durch weitere Gabe eines ACE-Hemmers erreicht werden [Elmarakby, et al. 2007]. In einer anderen Studie von Ortiz et al. konnte durch alleinige Tempol Gabe eine niedrig-Dosis induzierte Ang-II Hypertonie deutlich abgeschwächt werden [Ortiz, et al. 2001]. Die hypertensiven Eigenschaften des Angiotensin-II scheinen durch dessen ROS-Produktion nur unter bestimmten Voraussetzungen zum Tragen zu kommen. Unter hohen Ang-II Dosen scheint die direkte vasokonstriktive Wirkung durch MLCK Aktivierung in der glatten Gefäßmuskulatur den ROS Wirkungen durch Inaktivierung des EDRF (NO) zu überwiegen.

Guzik et al. konnten in Wildtypen eine signifikant höhere vaskuläre Superoxid Produktion als in Rag-1^{-/-} Mutanten nachweisen und erklärten dadurch die unterschiedliche Ausprägung der Hypertonie unter der in unserer und seiner Studie identisch genutzten Ang-II Dosis. Als Quelle der Superoxide sah er die NADPH Oxidase eingewanderter T-Lymphozyten. In vitro Versuche von Jackson et al. zeigten, dass T-Lymphozyten nach Aktivierung ihrer T-Zell Rezeptoren (TCR bzw. CD3) eine Superoxidproduktion durch die eigene NADPH Oxidase verrichten

[Jackson, et al. 2004]. Guzik konnte diese These in vivo untermauern, indem er Rag-1^{-/-} Mutanten durch homologen Transfer adulte T-Lymphozyten infundierte. Nach dem Transfer zeigten die Tiere unter nachfolgender Angiotensin-II Infusion ebenfalls erhöhte vaskuläre Superoxidkonzentrationen und interessanterweise eine arterielle Hypertonie wie Wildtypen. Ein Transfer von B-Lymphozyten zeigte diesen Effekt nicht, sodass von einer spezifischen T-lymphozytären Wirkung ausgegangen werden kann. Die Aktivierung der T-Lymphozyten und Ausschüttung von Superoxiden erfolgte nach Guzik durch eine Neoantigenformierung aufgrund druckbedingter Gefäßschäden und deren Bindung an den TCR der T-Lymphozyten, sowie möglicherweise direkt durch Angiotensin-II durch Aktivierung des T-lymphozytären AT₁R. Die These der Neoantigenformierung durch druckbedingte Schäden wurde ebenfalls in anderen Studien beschrieben [Guzik, et al. 2007], die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten über den AT₁R konnten Nataraj et al. in vitro nachweisen [Nataraj, et al. 1999].

An dieser Stelle würde interessieren, ob die vaskulären Superoxidkonzentrationen in den Versuchstieren unserer durchgeführten Experimente trotz gleich ausgeprägter Hypertonie zwischen den Versuchsgruppen identisch oder verschieden sind. Nachfolgende Arbeiten könnten diese Fragestellung näher beleuchten.

Neben den T-Lymphozyten wurden auch andere Quellen von Superoxiden beschrieben. Griendling et al. konnten durch in vitro Versuche zeigen, dass aus glatter Gefäßmuskulatur durch Angiotensin-II Wirkung Superoxide durch membrantändige NADPH-Oxidase freigesetzt werden [Griendling, et al. 1994]. In anderen Versuchen wurden ebenfalls erhöhte vaskuläre Superoxid Konzentrationen bei Desoxycorticosteronacetat (DOCA, ein aldosteronähnliches Mineralcorticoid) induzierter Hypertonie in Mäusen und Ratten festgestellt [Li und Shah 2004]. In diesem Modell ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron System aufgrund der negativen Feedbackhemmung des DOCA supprimiert [Tomaschitz, et al. 2010], sodass die ROS Freisetzung unabhängig vom Angiotensin-II sein müsste. Iwashima et. al. konnten weiterhin in kultivierten Endothelzellen eine durch Aldosteron ausgelöste Superoxidproduktion nachweisen [Iwashima, et al. 2008]. Demnach gibt es auch viele von lymphatischen Zellen und Angiotensin-II unabhängige Quellen der Superoxide im vaskulären Gewebe. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass auch bei DOCA-induzierter Hypertonie in vivo die vaskuläre Superoxid Produktion in Rag-1^{-/-} Mutanten schwächer als in Wildtypen ist [Guzik, et al. 2007], was die

These neu formierter Antigene durch Druckschädigungen jeglicher Art mit folgender Aktivierung T-Lymphozytärer NADPH Oxidase als plausibel erscheinen lässt. Die diversen Superoxid Synthesewege legen jedoch nahe, dass die Superoxidproduktion unter pathophysiologischen Bedingungen durch multifaktorielle Prozesse in vivo aktiviert wird, was auch eine mögliche Erklärung für unsere von Guzik abweichenden Ergebnisse ist. Möglicherweise hat unter unseren Bedingungen die von uns identisch genutzte Ang-II Dosis durch die direkt vasokonstriktorische Wirkung am AT₁R die modulatorischen ROS-Effekte überstrahlt.

Meiner Meinung nach ist die blutdruckmodulierende inflammatorisch-prooxidative Wirkung des Angiotensin-II in unserem genutzten Versuchsprotokoll als nachrangig zu sehen, weil

1. wir nach unserer Blutdruckanalyse keine Unterschiede zwischen Wildtypen und Rag-1^{-/-} Mutanten sowohl im systolischen als auch im diastolischen Blutdruck während Hypertonie-Induktion durch Ang-II feststellen konnten.
2. die direkten hämodynamischen Wirkungen von Ang-II am AT₁-Rezeptor die inflammatorisch blutdruckmodulierend wirksamen Komponenten möglicherweise vernachlässigbar machen und dadurch in der Analyse unerkannt bleiben.
3. durch die saubere Umgebung der Versuchstiere kein pathogener Stimulus für eine zusätzliche T-lymphozytäre Aktivierung vorlag und es dadurch zu keiner Neoantigenformierung mit konsekutiver ROS-Freisetzung auf Gefäßebene gekommen ist.
4. die in unser angebotenen Tiernahrung enthaltenen Elektrolyte möglicherweise eine andere Zusammensetzung hatten als die von Guzik genutzter Tiernahrung und dadurch z.B. Unterschiede in der Nierenfunktion vorliegen.

4.2.3.3. Gefäßmorphologie und –Relaxationsfähigkeit

In der myographischen Analyse sind sowohl bei Wildtypen als auch bei Rag-1^{-/-} Mutanten die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der glatten Muskulatur durch Nitroglyzerin und die endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin deutlich beeinträchtigt. Die Ang-II Behandlung hat erwartungsgemäß in Wildtypen zu einer globalen Schädigung der Gefäßfunktion hinsichtlich der Relaxation ge-

führt. Die durch Angiotensin-II und hohen Blutdruck hervorgerufene vaskuläre Dysfunktion wurde in vielen Studien, welche die gleiche Methodik nutzten, bereits vorbeschrieben [Rajagopalan, et al. 1996; Wynne, et al. 2012]. T-Lymphozyten scheinen in den Experimenten von Guzik et al. ein verstärkender Faktor dieser entstandenen Schäden zu sein [Guzik, et al. 2007] und könnten somit im Einklang mit der Superoxidtheorie ein verstärkender Faktor der Hypertonie sein. So konnte er zeigen, dass Rag-1^{-/-} Mäuse vor einem Verlust der Relaxationsfähigkeit durch die Wirkung von Angiotensin-II bzw. dem erhöhten Blutdruck geschützt sind. Ein Transfer von T-Lymphozyten in Rag-1^{-/-} Mutanten führte zu einer erhöhten Vulnerabilität der Gefäßfunktion, sodass sie ebenfalls Beeinträchtigungen in der Relaxationsfähigkeiten der Aorta zeigten, vergleichbar mit Wildtypen nach entsprechender Behandlung mit Angiotensin-II. Wir können diesen verstärkenden Faktor der T-Lymphozyten auf die Gefäßfunktion nicht feststellen. Unsere Rag-1^{-/-} Mutanten sowie die von uns genutzten Wildtypen zeigen beide unter Ang-II eine sowohl gleich schlechte maximale Relaxationsfähigkeit als auch eine gleich schlechte Sensitivität bei endothelabhängiger und endothelunabhängiger Vasorelaxation. Es müssen somit auch andere Prozesse vorliegen, welche die Gefäße in Rag-1^{-/-} Mutanten unabhängig von Lymphozyten geschädigt haben. Auch hier können die bereits oben genannten Mechanismen des Angiotensin-II, wie beispielsweise die Aktivierung von membranständiger NADPH Oxidase an VSMCs und folglich oxidative Schädigung, zu diesem Befund geführt haben. Griendling und Xi konnten im in vitro Modell zeigen, dass Angiotensin-II zu einer Freisetzung von ROS und Wachstumsfaktoren direkt aus kultivierten, isolierten glatten Gefäßmuskelzellen führt [Geisterfer, et al. 1988; Griendling, et al. 1994], sodass hier ebenfalls von Lymphozyten unabhängige Faktoren vorlagen, welche zur potenziell schädlichen ROS-Freisetzung und Gefäßhypertrophie geführt haben. Diese Annahme steht im Einklang mit unseren Befunden der vaskulären Hypertrophie. So konnten wir feststellen, dass Wildtypen und Rag-1^{-/-} Mutanten unter Ang-II eine gleich stark ausgeprägte Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur zeigen. Das Wachstum kann in diesem Fall über vorbeschriebene Hypertrophiemechanismen erklärt werden.

Eine Verstärkung vaskulärer Funktionsschäden und Hypertrophie durch T-Lymphozyten kann nicht eindeutig belegt werden, da

1. wir in der Analyse der aortalen Relaxationsfähigkeit von Rag-1^{-/-} Mutanten und Wildtypen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen beiden Versuchsgruppen feststellen konnten.
2. der globale Funktionsverlust der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasorelaxation in beiden Gruppen für einen stark schädigenden Prozess spricht, der mit direkt druckbedingten Schädigungen erklärbar wäre und proportional zum in beiden Genotypen gleich stark angestiegenen mittleren MAP ist.
3. Möglicherweise untergeordnete inflammatorische Prozesse durch zu geringen Anteil am Gesamtprozess nicht darstellbar wurden und vernachlässigbar sind, da unsere Versuchstiere durch die sehr keimfreie Umgebung keinem zusätzlichen proinflammatorischen Stimulus ausgesetzt waren.
4. inflammatorisch bedingte Veränderungen nicht in der Aorta, aber in kleinen, von uns nicht untersuchten Widerstandsgefäßen zum Tragen kommen.

4.2.3.4. Weiterführende Fragestellungen & Erklärungsansätze für Ergebnisdiskrepanzen

Es sollten weitere Versuche geplant werden, um die Rolle des adaptiven Immunsystems hinsichtlich der verursachten Gefäßschäden durch Superoxide und der konsekutiven Hypertonieverstärkung genauer zu eruieren und herauszufinden welche weiteren Faktoren das Zusammenspiel der beteiligten physiologischen bzw. pathophysiologischen Systeme beeinflussen. In weiteren Versuchen könnte mit telemetrischer Blutdruckmessung und myographischen sowie histologischen Gefäßuntersuchungen überprüft werden, ob T-Lymphozyten auch in anderen Hypertoniemodellen (z.B. genetische Modelle, Katecholamininfusion) einen direkten Einfluss auf die Superoxidproduktion und den Blutdruck ausüben. Ebenso sollte die Dosisabhängigkeit des Ang-II auf einen möglichen T-lymphozytären Einfluss untersucht werden. Ein weiteres Augenmerk kann auf die verschiedenen Subpopulationen der T-Lymphozyten gelegt werden. Barhoumi et al. zeigten, dass regulatorische T-Lymphozyten (T_{Reg}) eine Angiotensin-II vermittelte Hypertonie abschwächen können. In seinen Versuchen infundierte er C57BL/6J Wildtypen T_{Reg} und verglich diese Tiere während einer Angiotensin-II Infusion mit plazebobehandelten Kontrolltieren. Der Transfer von regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte

einen um etwa 20mmHg niedrigeren Blutdruck bei Angiotensin-II Infusion [Barhoumi, et al. 2011]. Dieser Einfluss der T_{Reg} wurde in unseren genutzten Rag-1^{-/-} Mutanten nicht untersucht, da diese keine T-Lymphozyten transfundiert bekamen. Hier bleibt die Fragestellung, ob sich dieser Effekt unter physiologischen Bedingungen ohne zusätzlichen T_{Reg} Transfer darstellen lässt. Hier könnte eine FACS-Analyse der einzelnen T-lymphozytären Subpopulationen mögliche Unterschiede in den eingesetzten Versuchstieren aufzeigen.

Weiterhin scheint die Dauer der Angiotensin-II Wirkung eine Rolle zu spielen. Bei Versuchen mit Interleukin-17 defizienten Mäusen durch Madhur et al. wurden beispielsweise deutliche Blutdruckunterschiede erst nach einer mehr als 14 Tage andauernden Ang-II Infusion festgestellt [Madhur, et al. 2010]. Interleukin-17 ist ein von Th₁₇-Lymphozyten ausgeschüttetes Zytokin, welchem in einigen Studien eine Rolle bei der Genese kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen zugesprochen wird. So konnten beispielsweise Xiang et al. in einer klinischen Studie zeigen, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom deutlich erhöhte Th₁₇ - Plasmaleveln gegenüber erniedrigten T_{Reg} - Plasmaleveln aufweisen [Cheng, et al. 2008]. Unser durchgeführtes Versuchsprotokoll könnte aufgrund der oben genannten später einsetzenden Beobachtung durch eine längere Ang-II Infusion modifiziert werden, um später einsetzende blutdruckmodulierende Mechanismen darzustellen.

Da Rag-1^{-/-} wie Wildtypen über ein intaktes angeborenes Immunsystem verfügen, könnte es auch in unseren Rag-1^{-/-} Mäusen proinflammatorische Faktoren auf Gefäßebene freigesetzt haben. Die Inflammation könnte demnach primär durch druckbedingte Gefäßschädigungen hervorgerufen worden sein. Packard et al. beschrieben einen großen Einfluss des angeborenen Immunsystems auf druckbedingte Schädigungen des Gefäßsystems. Dabei spielen besonders Makrophagen, Granulozyten und Thrombozyten eine Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Schäden durch erhöhte Druckwirkung am Endothel. Im Zusammenspiel mit dem adaptiven Immunsystem wurden durch Th₁-Lymphozyten verstärkende und durch Th₂- und T_{Reg} -Lymphozyten protektive Wirkungen auf die vaskulären Schädigungen beschrieben [Packard, René R S, et al. 2009]. Möglicherweise könnte hier die jeweilige Relation zwischen den Zellpopulationen des vom Rag-1 Gen unabhängigen angeborenen Immunsystems durch bestimmte Faktoren in unseren genutzten Rag-1^{-/-} Mäusen abweichend von denen im Versuch von Wu und Gu-

zik's Mäusen sein und somit die verschiedenen beobachteten Blutdruckwerte erklären.

4.2.3.5. Potenzielle methodische Fehlerquellen

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Daten könnte in der Methodik der Blutdruckmessung liegen: Die Blutdruckergebnisse von Guzik stützen sich hauptsächlich auf die Tailcuff-Methode, die nach einer Publikation von Whitesall et al. erhebliche Schwächen gegenüber der telemetrischen Blutdruckmessung aufweist [Whitesall, et al. 2004]. Bei dieser Methode werden die Versuchstiere aus ihrer gewohnten Käfigumgebung entnommen und für die Messung in einer engen Haltevorrichtung positioniert. Die hämodynamischen Daten werden dann mittels einer am Mäuseschwanz angebrachten Druckluftmanschette über eine Plethysmographie gewonnen. Dieses Verfahren stellt eine Stresssituation für die Versuchstiere dar und kann bei unterschiedlich ausgeprägter Stressresistenz der individuellen Versuchstiere zu verfälschten Ergebnissen führen. In Studien von Ibrahim, Berg und Hughes wurde beschrieben, dass mit dieser Methode insbesondere bei Angiotensin-II induzierten Hypertonien, falsch hohe Blutdruckwerte im Vergleich zur deutlich genaueren invasiven Bestimmung gemessen werden [Ibrahim, et al. 2006]. Weiterhin kann aufgrund des aufwändigen Prozedere keine kontinuierliche Datenerhebung über die gesamte Studiendauer erfolgen, sondern es können nur punktuelle Messungen durchgeführt werden. Unsere Daten zeigen demnach eine deutlich höhere Qualität in der Erhebung der hämodynamischen Parameter sowie der körperlichen Aktivität der Versuchstiere. Bei uns spiegelt sich auch während der Ang-II Infusion eine deutliche zirkadiane Rhythmik (mit Ausnahme der Rekonvaleszenzzeit nach der Implantation der osmotischen Pumpe) der Tiere wider, was für eine gut erhaltene Vitalität beider Versuchsgruppen spricht. Demnach scheint die genutzte Ang-II Dosierung trotz Blutdruckerhöhung nicht in einem ausgeprägten toxisch unphysiologischen Bereich zu liegen.

Mögliche weitere methodische Unterschiede sind neben der verwendeten Blutdruckmessmethode zum Beispiel schwer beeinflussbare Faktoren, wie stille mikrobielle Infektionen oder andere physiologische mikrobielle Besiedlungen der Mäuse, sodass hier unterschiedliche Faktoren zu einer Neoantigenformierung vorliegen können. Unsere genutzten Wildtyp Mäuse stammen zwar ebenfalls wie die Versuchstiere in den genannten Studien genetisch von The Jackson Laboratories USA, wurden aber in Laboren des deutschen Kooperationspartners Charles River

gezüchtet. Die genutzten Rag-1^{-/-} Mäuse wurden direkt von Jackson aus den USA importiert, jedoch wurden diese bereits über einige Generationen in unser eigenen Tierhaltung gezüchtet, sodass durch unsere Haltungs- und Ernährungsbedingungen eine Veränderung in der mikrobiellen Besiedlung der Mäuse (Mikrobiom) stattgefunden haben könnte. Pluznick konnte beispielsweise zeigen, dass bestimmte im Darm angesiedelte Bakterien durch deren Produktion von kurzkettigen Fettsäuren eine Fettsäuren-Rezeptor (Olfcr78) vermittelte Reninausschüttung auslösen und dadurch erhöhend auf den Blutdruck wirken [Pluznick 2014]. Ebenso könnten die verschiedenen im Gastrointestinaltrakt angesiedelten Mikroorganismen immunvermittelte Prozesse im Mukosa assoziiertem Lymphgewebe (MALT) auslösen und zu weiteren entzündlich bedingten Blutdruckveränderungen in den Versuchstieren geführt haben. Weiterhin haben mikrobielle Besiedlungen einen Einfluss auf die Relation zwischen T-Lymphozyten Subpopulationen. Eine weitere Beeinflussung der Hämodynamik kann über die durchgeführte Diät aufgetreten sein. So wurden unter Umständen durch die Tiernahrung unterschiedlich hohe Elektrolyt-Konzentrationen zugeführt. Hierbei interessiert besonders der jeweilige Gehalt von Na⁺ und K⁺ in der Nahrung. Aus den Publikationen von Guzik und Wu geht nicht der jeweils zugeführte Elektrolytgehalt über die Tiernahrung hervor. Eine folgende Studie in unserem Institut wird die Auswirkungen von Hoch- und Niedrigsalzdiät auf den Blutdruck von Rag-1^{-/-} Mäusen unter Angiotensin-II induzierter arterieller Hypertonie untersuchen.

Hinsichtlich der Power unserer Studie konnte eine mit einem n=8 pro Versuchsgruppe akzeptable Versuchstieranzahl erreicht werden. Diese Anzahl ist bei telemetrischen Messungen des Blutdruckes üblich, da auch bei dieser vergleichsweise geringen Versuchstieranzahl hämodynamisch relevante Unterschiede signifikant dargestellt werden können. Durch eine Erhöhung der Versuchstieranzahl könnte die Power der statistischen Auswertung weiter erhöht werden, um so auch kleinste Unterschiede aufzudecken.

4.2.4. Myokardiale Hypertrophie und Fibrose

In beiden Versuchsgruppen ist das Ventrikelgewicht in der Ang-II Gruppe im Vergleich zur genotypidentischen Kontrollgruppe gleichermaßen erhöht. Die Wirkung des erhöhten Blutdrucks und von Angiotensin-II selbst haben wie bereits vorbeschrieben zu einer myokardialen Hypertrophie geführt [Crowley, et al. 2006]. Zwar haben in unserem Versuch Rag-1^{-/-} Mutanten mit und ohne Angiotensin-II Behand-

lung ein geringfügig kleineres Ventrikelgewicht/Körpergewicht Verhältnis als Wildtypen, jedoch zeigt sich in beiden Gruppen nach Angiotensin-II Behandlung eine vergleichbare Zunahme des Ventrikelgewichts, sodass von einer gleich stark ausgeprägten Hypertrophie ausgegangen werden kann. Der Immundefekt der Rag-1^{-/-} Linie hat in diesem Modell unter dem Einfluss von Angiotensin-II und konsekutiv erhöhter Nachlast durch Erhöhung des diastolischen Blutdrucks keine Auswirkungen auf die myokardiale Hypertrophieentwicklung. Crowley et al. zeigten eine gegenüber Wildtypen abgemilderte myokardiale Hypertrophie nach 28-tägiger Angiotensin-II Infusion in SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) Mäusen (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J), welche wie Rag-1^{-/-} Mutanten über keine funktionsfähigen Lymphozyten verfügen [Crowley, et al. 2010]. In diesem Modell wurde jedoch eine doppelt so hohe Ang-II Dosis wie in unseren Versuchen genutzt. Weiterhin wurde vor Versuchsbeginn eine einseitige Nephrektomie bei den Versuchstieren durchgeführt. In dieser SCID Mauslinie können jedoch auch spontane Störungen des angeborenen Immunsystems auftreten, sodass hier ein möglicher phänotypischer Unterschied zur Rag-1^{-/-} Linie besteht. Crowley erklärte die abgemilderte myokardiale Hypertrophie in SCID-Mäusen mit einem während der Angiotensin-II Infusion auch im Vergleich zum Wildtypen niedrigeren Blutdruck, sodass die kleinere Nachlast konsekutiv auch zu einer geringeren Hypertrophie führte.

Myokardial eingelagertes Kollagen ist nach Ang-II Infusion in Wildtypen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, wohingegen bei den immundefizienten Rag-1^{-/-} Mäusen nach der 14-tägigen Angiotensin-II Wirkung keine signifikante Kollagenvermehrung im Myokard festzustellen ist. Grundsätzlich sind myokardiale Hypertrophie sowie die verstärkte Kollagenbildung durch vorbeschriebene Wirkungen des Angiotensin-II auf Wachstumsfaktoren, Makrophagen und kardiale NADPH Oxidase zu erklären [Kurdi und Booz 2011; Yagi, et al. 2010; Nabeebaccus, et al. 2011]. Oxidativem Stress wird in vielen Studien eine große Rolle in der kardialen Hypertrophie und fibrösen Remodeling zugesprochen [Takimoto und Kass 2007]. In Modellen mit 6 Wochen andauernder DOCA-Salz induzierter Hypertonie wurden neben der Druckbelastung des Myokards auch ausgelöster oxidativer Stress, humorale Faktoren und Endothelin als profibrotische Faktoren identifiziert [Karam, et al. 1996; Callera, et al. 2003]. Versuche von Mu et. al bewiesen außerdem, dass CD8⁺ T-Lymphozyten bei Ang-II induzierter Hypertonie einen proinflammatorischen Effekt im Myokard ausüben [Ma, et al. 2014]. Interferon- γ defiziente Mäuse zeigen eine deutlich verminderte Makrophagen- und T-Lymphozyten Infiltration

und kardiale Fibrose als Wildtypen. Die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Makrophagen über Interferon- γ bei Ang-II induzierter Hypertonie ist ein wesentlicher Faktor der kardialen Fibrose [Han, et al. 2012]. Die vorgelegten Ergebnisse dieser Arbeit stehen mit diesen Vorergebnissen im Einklang und zeigen trotz gleich stark ausgeprägter Hypertonie eine geringere Myokardfibrose in T-Lymphozyten defizienten Mäusen. Die Myokardfibrose ist bei der genutzten Ang-II Dosis demnach nicht primär abhängig vom herrschenden arteriellen Druck, sondern vor allem abhängig von der Anwesenheit der T-Lymphozyten und dem zirkulierenden Angiotensin-II. Kardial konzentriertes Angiotensin-II könnte zu einer Aktivierung T-Lymphozytärer NADPH-Oxidase und weiterer parakriner Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interferon- γ geführt haben. Eine frühere Arbeit von Xu et al. konnte im Mausmodell zeigen, dass nur lokal am Herzen konzentriertes Angiotensin-II bereits proinflammatorisch und fibrosierend am Myokard wirkt, jedoch ohne untersuchten Zusammenhang zu T-Lymphozyten [Xu, et al. 2010].

Meiner Meinung nach sind T-Lymphozyten in myokardiales Remodeling involviert, weil

1. wir zeigen konnten, dass Rag-1^{-/-} Mutanten eine abgemilderte Kollagenablagerung im myokardialen Interstitium bei Ang-II Infusion aufweisen und mögliche Kausalketten in anderen Versuchen gut vorbeschrieben sind.
2. die Abmilderung der Fibrose in unserem Modell nicht von der Nachlast abhängig ist und somit auch blutdruckunabhängige Prozesse, in welche T-Lymphozyten involviert sind, profibrosierend wirken.

5. Zusammenfassung

Experimentelle Untersuchungen zur Hämodynamik & kardiovaskulären Schäden einer Angiotensin-II induzierten arteriellen Hypertonie in Rag-1^{-/-} Mäusen.

Viele Studien zur Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie und kardialen fibrösen Remodeling konnten einen Zusammenhang mit Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im kardiovaskulären Gewebe beweisen. ROS dienen der physiologischen Signaltransduktion, können aber bei Missverhältnissen auch pathologische Prozesse wie endotheliale Dysfunktion und kardiales fibröses Remodeling triggern. Vorangegangene Arbeiten zeigten eine verstärkte ROS-Produktion durch T-Lymphozyten in vaskulären Geweben bei Angiotensin-II induzierter Hypertonie in Mäusen. Immundefiziente Mäuse (Rag-1^{-/-}), welche über keine adulten T-Lymphozyten verfügen, zeigten im gleichen Modell eine geringere ROS-Produktion, geringere endotheliale Schäden und eine geringere Ausprägung der Hypertonie als Wildtypen. Diese Arbeit untersucht die Hypothese der T-Lymphozyten vermittelten Verstärkung einer Angiotensin-II induzierten Hypertonie durch einen Vergleich des Blutdruckes von Rag-1^{-/-} Mutanten mit Wildtypen bei Angiotensin-II Infusion. Dabei bedienen wir uns methodisch einer genauen und hochqualitativen Blutdruckerfassung mittels einer invasiven, radiotelemetrischen Blutdruckmessung. Nach Beendigung der Messung wurden funktionelle und morphologische Schäden an Herz und Aorta untersucht. Der Versuch zeigte, dass der mittlere arterielle Druck, sowie der systolische- und diastolische Blutdruck von Wildtypen und Rag-1^{-/-} Mäusen während 14-tägiger Angiotensin-II Infusion gegenüber Basisbedingungen um etwa 30% angestiegen ist. Beide Versuchsgruppen reagieren auf das Angiotensin-II hinsichtlich des Blutdruckes nahezu identisch. Diese Studie zeigt keine Abschwächung einer arteriellen Hypertonie bei T-Lymphozyten defizienten Mäusen, sondern den gleichen Anstieg des arteriellen Mitteldruckes wie bei Wildtypen. Die Untersuchung der Endorgane zeigte, dass T-Lymphozyten keine Auswirkungen auf myokardiale Hypertrophie, Endothelschäden und die Morphologie der glatten Gefäßmuskulatur haben. Im Gegensatz dazu konnten wir jedoch feststellen, dass Wildtypen durch Angiotensin-II eine deutlich stärkere myokardiale Fibrose entwickeln als Rag-1^{-/-}. T-Lymphozyten scheinen ein verstärkender Faktor von kardialen Remodeling bei einer Angiotensin-II induzierten, arteriellen Hypertonie zu sein.

Abstract

Experimental research on hemodynamics & cardiovascular tissue damage in angiotensin-II induced arterial hypertension in Rag-1^{-/-} mice.

Many studies on the pathophysiology of arterial hypertension and cardiac fibrous remodeling were associated with high concentrations of reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular tissue. ROS serve as important molecules in physiological signal transduction, but can also trigger pathological processes in mismatches, such as endothelial dysfunction and cardiac fibrous remodeling. Previous work showed increased ROS production by T-lymphocytes in vascular tissues during angiotensin-II induced hypertension in mice. Immunodeficient mice (Rag-1^{-/-}) which have no adult T-lymphocytes showed in the same setting a lower ROS production, less endothelial damage and a lower severity of hypertension than wild types. This work examines the hypothesis of T-lymphocyte mediated amplification of an angiotensin-II induced hypertension by comparing the arterial blood pressure of Rag-1^{-/-} mutants with C57BL/6 wild types during angiotensin-II infusion. Here we methodically used an accurate and high quality blood pressure sensing device by means of an invasive, radiotelemetry blood pressure measurement. After completion of the measurement, we examined functional and morphological damage to the heart and aorta. Our Data showed that the mean arterial pressure, the systolic- and diastolic blood pressure has risen both in wildtypes and Rag-1^{-/-} mice by about 30% during 14 days of angiotensin-II infusion compared to baseline conditions. Both experimental groups respond to angiotensin-II in terms of blood pressure rise almost identical. This study does not show any blunting of arterial hypertension in T-lymphocyte deficient mice, but the same increase in mean arterial pressure as wild types. Examination of the end organs showed that T-lymphocytes have no effect on myocardial hypertrophy, endothelial damage and the morphology of vascular tissues. In contrast, we found that wild types by angiotensin-II infusion significantly increased myocardial fibrosis compared to Rag-1^{-/-} mutants. T-lymphocytes appear to be an aggravating factor of cardiac remodeling in angiotensin-II induced hypertension.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme 2
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ang-(1-7)	Angiotensin-1-7
Ang-I	Angiotensin-I
Ang-II	Angiotensin-II
Ang-IV	Angiotensin-IV
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APA	Aminopeptidase A
AQP2	Aquaporin Typ-2
AS	Aminosäuren
AT ₁ R	AT ₁ -Rezeptor
AT ₂ R	AT ₂ -Rezeptor
AT ₄ R	AT ₄ -Rezeptor
AT ₇ R	AT ₇ -Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
E _{Na} C	Epithelialer Natriumkanal
eNOS	Endotheliale Nitrooxigenase
FACS	Flourescence activated cell sorting system
HF	Herzfrequenz
HZV	Herz-Zeit-Volumen
I	Stromstärke
KO	Knockout
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MHC-I	Major Histocompatibility Complex I
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II
MR	Mineralcorticoidrezeptor
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NTG	Nitroglyzerin
P _{Dia}	Diastolischer Blutdruck
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
P _{Sys}	Systolischer Blutdruck
R	Widerstand
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TPR	Total peripherer Widerstand
U	Spannung (Druckdifferenz)
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
ZVD	Zentral venöser Druck

7. Literaturverzeichnis

- Aderem, A.; Underhill, D. M. (1999). **Mechanisms of phagocytosis in macrophages**. Annual review of immunology. 17(): 593–623. PMID:[10358769](#).
- Barhoumi, Tlili; Kasal, Daniel A.; Li, Melissa W.; Shbat, Layla; Laurant, Pascal; Neves, Mario F.; Paradis, Pierre; Schiffrin, Ernesto L. (2011). **T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury**. Hypertension. 57(3): 469–476. PMID:[21263125](#).
- Beard, Daniel A.; Mescam, Muriel (2012). **Mechanisms of pressure-diuresis and pressure-natriuresis in Dahl salt-resistant and Dahl salt-sensitive rats**. BMC physiology. 12(): 6. PMID:[22583378](#).
- Berk, B. C.; Vekshtein, V.; Gordon, H. M.; Tsuda, T. (1989). **Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells**. Hypertension. 13(4): 305–314. PMID:[2466788](#).
- Boehm, Thomas (2011). **Design principles of adaptive immune systems**. Nature reviews. Immunology. 11(5): 307–317. PMID:[21475308](#).
- Busse, R.; Fleming, I. (1998). **Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors**. Journal of vascular research. 35(2): 73–84. PMID:[9588870](#).
- Calabi, F.; Milstein, C. (1986). **A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6**. Nature. 323(6088): 540–543. PMID:[3093894](#).
- Callera, Glaucia E.; Touyz, Rhian M.; Teixeira, Simone A.; Muscara, Marcelo N.; Carvalho, Maria Helena C.; Fortes, Zuleica B.; Nigro, Dorothy; Schiffrin, Ernesto L.; Tostes, Rita C. (2003). **ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension**. Hypertension. 42(4): 811–817. PMID:[12913063](#).
- Chappell, Mark C. (2007). **Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure?** Hypertension. 50(4): 596–599. PMID:[17785634](#).
- Chappell, Mark C. (2012). **Nonclassical renin-angiotensin system and renal function**. Comprehensive Physiology. 2(4): 2733–2752. PMID:[23720263](#).
- Chen, S. Y.; Bhargava, A.; Mastroberardino, L.; Meijer, O. C.; Wang, J.; Buse, P.; Firestone, G. L.; Verrey, F.; Pearce, D. (1999). **Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96(5): 2514–2519. PMID:[10051674](#).
- Cheng, Jilin; Ke, Qingen; Jin, Zhuang; Wang, Haibin; Kocher, Olivier; Morgan, James P.; Zhang, Jielin; Crumpacker, Clyde S. (2009). **Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure**. PLoS pathogens. 5(5): e1000427. PMID:[19436702](#).
- Cheng, Xiang; Yu, Xian; Ding, Ying-Jun; Fu, Qing-Qing; Xie, Jiang-Jiao; Tang, Ting-Ting; Yao, Rui; Chen, Yong; Liao, Yu-Hua (2008). **The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome**. Clinical immunology (Orlando, Fla.). 127(1): 89–97. PMID:[18294918](#).

Cifuentes, M. E.; Rey, F. E.; Carretero, O. A.; Pagano, P. J. (2000). **Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice.** American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 279(5): H2234-40. PMID:[11045958](#).

Coleman, J. K.; Krebs, L. T.; Hamilton, T. A.; Ong, B.; Lawrence, K. A.; Sardinia, M. F.; Harding, J. W.; Wright, J. W. (1998). **Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV binding sites and angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats.** Peptides. 19(2): 269–277. PMID:[9493859](#).

Crawford, D. C.; Chobanian, A. V.; Brecher, P. (1994). **Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat.** Circulation research. 74(4): 727–739. PMID:[8137508](#).

Crowley, Steven D.; Gurley, Susan B.; Herrera, Maria J.; Ruiz, Phillip; Griffiths, Robert; Kumar, Anil P.; Kim, Hyung-Suk; Smithies, Oliver; Le, Thu H.; Coffman, Thomas M. (2006). **Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103(47): 17985–17990. PMID:[17090678](#).

Crowley, Steven D.; Song, Young-Soo; Lin, Eugene E.; Griffiths, Robert; Kim, Hyung-Suk; Ruiz, Phillip (2010). **Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension.** American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology. 298(4): R1089-97. PMID:[20147609](#).

Dampney, R A L; Horiuchi, J.; Killinger, S.; Sheriff, M. J.; Tan, P S P; McDowall, L. M. (2005). **Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions.** Clinical and experimental pharmacology & physiology. 32(5-6): 419–425. PMID:[15854152](#).

de Bold, A J; Borenstein, H. B.; Veress, A. T.; Sonnenberg, H. (2001). **A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from Life Sci. 28:89-94, 1981.** Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 12(2): 403-9; discussion 403-8, 408-9. PMID:[11158233](#).

Dikalov, Sergey I.; Ungvari, Zoltan (2013). **Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension.** American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 305(10): H1417-27. PMID:[24043248](#).

DSI. **PhysioTel® PA Implant Specifications.**

<http://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/specification-overview>.

Elmarakby, Ahmed A.; Williams, Jan M.; Imig, John D.; Pollock, Jennifer S.; Pollock, David M. (2007). **Synergistic actions of enalapril and tempol during chronic angiotensin II-induced hypertension.** Vascular pharmacology. 46(2): 144–151. PMID:[17112788](#).

Evans, Roger G.; Majid, Dewan S A; Eppel, Gabriela A. (2005). **Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out.** Clinical and experimental pharmacology & physiology. 32(5-6): 400–409. PMID:[15854149](#).

Fernandez-Alfonso, M. S.; Ganten, D.; Paul, M. (1992). **Mechanisms of cardiac growth. The role of the renin-angiotensin system.** Basic research in cardiology. 87 Suppl 2(): 173–181. PMID:[1299208](#).

Fiebeler, Anette; Muller, Dominik N.; Shagdarsuren, Erdenechimeg; Luft, Friedrich C. (2007). ***Aldosterone, mineralocorticoid receptors, and vascular inflammation***. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 16(2): 134–142. PMID:[17293689](#).

Fuller, Peter J.; Young, Morag J. (2005). ***Mechanisms of mineralocorticoid action***. *Hypertension*. 46(6): 1227–1235. PMID:[16286565](#).

Furchgott, R. F.; Vanhoutte, P. M. (1989). ***Endothelium-derived relaxing and contracting factors***. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 3(9): 2007–2018. PMID:[2545495](#).

Ganz, Tomas (2002). ***Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract***. *The Journal of clinical investigation*. 109(6): 693–697. PMID:[11901174](#).

Geisterfer, A. A.; Peach, M. J.; Owens, G. K. (1988). ***Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells***. *Circulation research*. 62(4): 749–756. PMID:[3280155](#).

Griendling, K. K.; Minieri, C. A.; Ollerenshaw, J. D.; Alexander, R. W. (1994). ***Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells***. *Circulation research*. 74(6): 1141–1148. PMID:[8187280](#).

Griendling, K. K.; Sorescu, D.; Ushio-Fukai, M. (2000). ***NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease***. *Circulation research*. 86(5): 494–501. PMID:[10720409](#).

Guang, Cuie; Phillips, Robert D.; Jiang, Bo; Milani, Franco (2012). ***Three key proteases--angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin--within and beyond the renin-angiotensin system***. *Archives of cardiovascular diseases*. 105(6-7): 373–385. PMID:[22800722](#).

Guyton, A. C. (1991). ***Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids***. *Science (New York, N.Y.)*. 252(5014): 1813–1816. PMID:[2063193](#).

Guzik, Tomasz J.; Hoch, Nyssa E.; Brown, Kathryn A.; McCann, Louise A.; Rahman, Ayaz; Dikalov, Sergey; Goronzy, Jorg; Weyand, Cornelia; Harrison, David G. (2007). ***Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction***. *The Journal of experimental medicine*. 204(10): 2449–2460. PMID:[17875676](#).

Han, Ya-lei; Li, Yu-lin; Jia, Li-xin; Cheng, Ji-zhong; Qi, Yong-fen; Zhang, Hong-jia; Du, Jie (2012). ***Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN- γ and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis***. *PLoS one*. 7(5): e35506. PMID:[22567105](#).

Harrison, David G.; Guzik, Tomasz J.; Lob, Heinrich E.; Madhur, Meena S.; Marvar, Paul J.; Thabet, Salim R.; Vinh, Antony; Weyand, Cornelia M. (2011). ***Inflammation, immunity, and hypertension***. *Hypertension*. 57(2): 132–140. PMID:[21149826](#).

HENRY, J. P.; GAUER, O. H.; REEVES, J. L. (1956). ***Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow***. *Circulation research*. 4(1): 85–90. PMID:[13277115](#).

Huang, P. L.; Huang, Z.; Mashimo, H.; Bloch, K. D.; Moskowitz, M. A.; Bevan, J. A.; Fishman, M. C. (1995). ***Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase***. *Nature*. 377(6546): 239–242. PMID:[7545787](#).

- Ibrahim, Jamila; Berk, Bradford C.; Hughes, Alun D. (2006). **Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats.** *Clinical and experimental hypertension* (New York, N.Y. : 1993). 28(1): 57–72. PMID:[16443565](#).
- Irani, K. (2000). **Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival.** *Circulation research*. 87(3): 179–183. PMID:[10926866](#).
- Iwashima, Fumiko; Yoshimoto, Takanobu; Minami, Isao; Sakurada, Maya; Hirono, Yuki; Hirata, Yukio (2008). **Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells.** *Endocrinology*. 149(3): 1009–1014. PMID:[18079208](#).
- Jackson, Sharon H.; Devadas, Satish; Kwon, Jaeyul; Pinto, Ligia A.; Williams, Mark S. (2004). **T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation.** *Nature immunology*. 5(8): 818–827. PMID:[15258578](#).
- Julien, C.; Zhang, Z. Q.; Barrès, C. (1995). **How sympathetic tone maintains or alters arterial pressure.** *Fundamental & clinical pharmacology*. 9(4): 343–349. PMID:[8566933](#).
- Karam, H.; Heudes, D.; Hess, P.; Gonzales, M. F.; Löffler, B. M.; Clozel, M.; Clozel, J. P. (1996). **Respective role of humoral factors and blood pressure in cardiac remodeling of DOCA hypertensive rats.** *Cardiovascular research*. 31(2): 287–295. PMID:[8730406](#).
- Katusic, Z. S.; Shepherd, J. T.; Vanhoutte, P. M. (1988). **Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries.** *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 19(4): 476–479. PMID:[3129826](#).
- Kiowski, W.; Lüscher, T. F.; Linder, L.; Bühler, F. R. (1991). **Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor.** *Circulation*. 83(2): 469–475. PMID:[1846783](#).
- Knepper, Mark A.; Nielsen, Soren (2004). **Peter Agre, 2003 Nobel Prize winner in chemistry.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 15(4): 1093–1095. PMID:[15034115](#).
- Koyama, Shohei; Ishii, Ken J.; Coban, Cevayir; Akira, Shizuo (2008). **Innate immune response to viral infection.** *Cytokine*. 43(3): 336–341. PMID:[18694646](#).
- Kuhn, Michaela (2012). **Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides.** *British journal of pharmacology*. 166(2): 522–531. PMID:[22220582](#).
- Kurdi, Mazen; Booz, George W. (2011). **New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis.** *Hypertension*. 57(6): 1034–1038. PMID:[21502563](#).
- Landmesser, Ulf; Cai, Hua; Dikalov, Sergey; McCann, Louise; Hwang, Jinah; Jo, Hanjoong; Holland, Steven M.; Harrison, David G. (2002). **Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II.** *Hypertension*. 40(4): 511–515. PMID:[12364355](#).
- LAS VENDI (2010). **Status 02/10, LASQCdiet® Rod16-R. 2010()**.

- Laursen, J. B.; Rajagopalan, S.; Galis, Z.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Harrison, D. G. (1997). ***Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension.*** *Circulation*. 95(3): 588–593. PMID:[9024144](#).
- Lewington, Sarah; Clarke, Robert; Qizilbash, Nawab; Peto, Richard; Collins, Rory (2002). ***Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies.*** *Lancet*. 360(9349): 1903–1913. PMID:[12493255](#).
- Li, Jian-Mei; Shah, Ajay M. (2004). ***Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology.*** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 287(5): R1014-30. PMID:[15475499](#).
- Li, P.; Sur, S. H.; Mistlberger, R. E.; Morris, M. (1999). ***Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice.*** *The American journal of physiology*. 276(2 Pt 2): R500-4. PMID:[9950930](#).
- Liu, Jianhua; Yang, Fang; Yang, Xiao-Ping; Jankowski, Michelle; Pagano, Patrick J. (2003). ***NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy.*** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 23(5): 776–782. PMID:[12637340](#).
- Lu, H. K.; Fern, R. J.; Luthin, D.; Linden, J.; Liu, L. P.; Cohen, C. J.; Barrett, P. Q. (1996). ***Angiotensin II stimulates T-type Ca²⁺ channel currents via activation of a G protein, Gi.*** *The American journal of physiology*. 271(4 Pt 1): C1340-9. PMID:[8897841](#).
- Ma, Feifei; Feng, Jin; Zhang, Chao; Li, Yulin; Qi, Guanming; Li, Huihua; Wu, Yuzhang; Fu, Yangxin; Zhao, Yang; Chen, Hairong; Du, Jie; Tang, Hong (2014). ***The requirement of CD8⁺ T cells to initiate and augment acute cardiac inflammatory response to high blood pressure.*** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 192(7): 3365–3373. PMID:[24600037](#).
- Madhur, Meena S.; Lob, Heinrich E.; McCann, Louise A.; Iwakura, Yoichiro; Blinder, Yelena; Guzik, Tomasz J.; Harrison, David G. (2010). ***Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction.*** *Hypertension*. 55(2): 500–507. PMID:[20038749](#).
- Maggadottir, Solrun M.; Sullivan, Kathleen E. (2014). ***The intersection of immune deficiency and autoimmunity.*** *Current opinion in rheumatology*. 26(5): 570–578. PMID:[25014038](#).
- Majzunova, Miroslava; Dovinova, Ima; Barancik, Miroslav; Chan, Julie Y H (2013). ***Redox signaling in pathophysiology of hypertension.*** *Journal of biomedical science*. 20(): 69. PMID:[24047403](#).
- Marvar, Paul J.; Thabet, Salim R.; Guzik, Tomasz J.; Lob, Heinrich E.; McCann, Louise A.; Weyand, Connie; Gordon, Frank J.; Harrison, David G. (2010). ***Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension.*** *Circulation research*. 107(2): 263–270. PMID:[20558826](#).
- Medzhitov, R.; Janeway, C. A. (1997). ***Innate immunity: impact on the adaptive immune response.*** *Current opinion in immunology*. 9(1): 4–9. PMID:[9039775](#).
- Mehta, Puja K.; Griending, Kathy K. (2007). ***Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system.*** *American journal of physiology. Cell physiology*. 292(1): C82-97. PMID:[16870827](#).

- Messerli, Franz H.; Williams, Bryan; Ritz, Eberhard (2007). **Essential hypertension**. *Lancet*. 370(9587): 591–603. PMID:[17707755](#).
- Mombaerts, P.; Iacomini, J.; Johnson, R. S.; Herrup, K.; Tonegawa, S.; Papaioannou, V. E. (1992). **RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes**. *Cell*. 68(5): 869–877. PMID:[1547488](#).
- Moncada, S.; Gryglewski, R.; Bunting, S.; Vane, J. R. (1976). **An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation**. *Nature*. 263(5579): 663–665. PMID:[802670](#).
- Morton, Jonathan; Coles, Barbara; Wright, Kate; Gallimore, Awen; Morrow, Jason D.; Terry, Erin S.; Anning, Peter B.; Morgan, B. Paul; Dioszeghy, Vincent; Kühn, Hartmut; Chaitidis, Pavlos; Hobbs, Adrian J.; Jones, Simon A.; O'Donnell, Valerie B. (2008). **Circulating neutrophils maintain physiological blood pressure by suppressing bacteria and IFN γ -dependent iNOS expression in the vasculature of healthy mice**. *Blood*. 111(10): 5187–5194. PMID:[18281503](#).
- Mügge, A.; Elwell, J. H.; Peterson, T. E.; Hofmeyer, T. G.; Heistad, D. D.; Harrison, D. G. (1991). **Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits**. *Circulation research*. 69(5): 1293–1300. PMID:[1934359](#).
- Nabeebaccus, Adam; Zhang, Min; Shah, Ajay M. (2011). **NADPH oxidases and cardiac remodelling**. *Heart failure reviews*. 16(1): 5–12. PMID:[20658317](#).
- Nataraj, C.; Oliverio, M. I.; Mannon, R. B.; Mannon, P. J.; Audoly, L. P.; Amuchastegui, C. S.; Ruiz, P.; Smithies, O.; Coffman, T. M. (1999). **Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway**. *The Journal of clinical investigation*. 104(12): 1693–1701. PMID:[10606623](#).
- Neefjes, Jacques; Jongsma, Marlieke L M; Paul, Petra; Bakke, Oddmund (2011). **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation**. *Nature reviews. Immunology*. 11(12): 823–836. PMID:[22076556](#).
- Nielsen, S.; Chou, C. L.; Marples, D.; Christensen, E. I.; Kishore, B. K.; Knepper, M. A. (1995). **Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(4): 1013–1017. PMID:[7532304](#).
- Nishio, E.; Watanabe, Y. (1997). **The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration**. *British journal of pharmacology*. 121(4): 665–670. PMID:[9208132](#).
- O Hartaigh, Bríain; Bosch, Jos A.; Carroll, Douglas; Hemming, Karla; Pilz, Stefan; Loerbroks, Adrian; Kleber, Marcus E.; Grammer, Tanja B.; Fischer, Joachim E.; Boehm, Bernhard O.; März, Winfried; Thomas, G. Neil (2013). **Evidence of a synergistic association between heart rate, inflammation, and cardiovascular mortality in patients undergoing coronary angiography**. *European heart journal*. 34(12): 932–941. PMID:[23178644](#).
- Ortiz, M. C.; Manriquez, M. C.; Romero, J. C.; Juncos, L. A. (2001). **Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin**. *Hypertension*. 38(3 Pt 2): 655–659. PMID:[11566950](#).

- Packard, René R S; Lichtman, Andrew H.; Libby, Peter (2009). ***Innate and adaptive immunity in atherosclerosis***. Seminars in immunopathology. 31(1): 5–22. PMID:[19449008](#).
- Parsons, A. A.; Schilling, L.; Wahl, M. (1991). ***Analysis of acetylcholine-induced relaxation of rabbit isolated middle cerebral artery: effects of inhibitors of nitric oxide synthesis, Na,K-ATPase, and ATP-sensitive K channels***. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 11(4): 700–704. PMID:[1646828](#).
- Paul, Martin; Poyan Mehr, Ali; Kreutz, Reinhold (2006). ***Physiology of local renin-angiotensin systems***. Physiological reviews. 86(3): 747–803. PMID:[16816138](#).
- Persson, P. B. (1996). ***Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction***. Physiological reviews. 76(1): 193–244. PMID:[8592729](#).
- Pluznick, Jennifer (2014). ***A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation***. Gut microbes. 5(2): 202–207. PMID:[24429443](#).
- Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Münzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Griending, K. K.; Harrison, D. G. (1996). ***Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone***. The Journal of clinical investigation. 97(8): 1916–1923. PMID:[8621776](#).
- Rao, G. N.; Berk, B. C. (1992). ***Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression***. Circulation research. 70(3): 593–599. PMID:[1371430](#).
- Rassow. ***Biochemie*** 2008. 2., aktualisierte Aufl. S. 492. ISBN 3131253525.
- Sadurska, Elżbieta; Jawniak, Renata; Majewski, Marek; Czekajska-Chehab, Elżbieta (2012). ***Takayasu arteritis as a cause of arterial hypertension. Case report and literature review***. European journal of pediatrics. 171(5): 863–869. PMID:[22290282](#).
- Slater, J. D. (1969). ***The role of the renin-angiotensin system in the control of aldosterone secretion***. Proceedings of the Royal Society of Medicine. 62(12): 1251–1253. PMID:[4312096](#).
- Somlyo, A. P.; Somlyo, A. V. (1994). ***Signal transduction and regulation in smooth muscle***. Nature. 372(6503): 231–236. PMID:[7969467](#).
- Sugamura, Koichi; Keaney, John F. (2011). ***Reactive oxygen species in cardiovascular disease***. Free radical biology & medicine. 51(5): 978–992. PMID:[21627987](#).
- Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2009). ***Innate immunity to virus infection***. Immunological reviews. 227(1): 75–86. PMID:[19120477](#).
- Takimoto, Eiki; Kass, David A. (2007). ***Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling***. Hypertension. 49(2): 241–248. PMID:[17190878](#).
- Tang, K. Mary; Wang, Guang-rong; Lu, Ping; Karas, Richard H.; Aronovitz, Mark; Heximer, Scott P.; Kaltenbronn, Kevin M.; Blumer, Kendall J.; Siderovski, David P.; Zhu, Yan; Mendelsohn, Michael E.; Tang, Mary; Wang, Guang (2003). ***Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure***. Nature medicine. 9(12): 1506–1512. PMID:[14608379](#).
- TECNIPLAST (Juli 2007). ***Ausstattung für Tierhaltungen, Katalog***.

The Jackson Laboratory. 10.05.2015. **B6.129S7-Rag1tm1Mom/J**.

<http://jaxmice.jax.org/strain/002216.html>.

The Jackson Laboratory. 10.05.2015. **C57BL/6J**.

<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>.

Timmers, Henri J L M; Wieling, Wouter; Karemaker, John M.; Lenders, Jacques W M (2003). **Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans**. The Journal of physiology. 553(Pt 1): 3–11. PMID:[14528027](#).

Tomaschitz, Andreas; Pilz, Stefan; Ritz, Eberhard; Obermayer-Pietsch, Barbara; Pieber, Thomas R. (2010). **Aldosterone and arterial hypertension**. Nature reviews. Endocrinology. 6(2): 83–93. PMID:[20027193](#).

Tsai, J. C.; Jain, M.; Hsieh, C. M.; Lee, W. S.; Yoshizumi, M.; Patterson, C.; Perrella, M. A.; Cooke, C.; Wang, H.; Haber, E.; Schlegel, R.; Lee, M. E. (1996). **Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells**. The Journal of biological chemistry. 271(7): 3667–3670. PMID:[8631978](#).

Tsukamoto, Yasumasa; Mano, Toshiaki; Sakata, Yasushi; Ohtani, Tomohito; Takeda, Yasuharu; Tamaki, Shunsuke; Omori, Yosuke; Ikeya, Yukitoshi; Saito, Yuki; Ishii, Ryohei; Higashimori, Mitsuru; Kaneko, Makoto; Miwa, Takeshi; Yamamoto, Kazuhiro; Komuro, Issei (2013). **A novel heart failure mice model of hypertensive heart disease by angiotensin II infusion, nephrectomy, and salt loading**. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 305(11): H1658-67. PMID:[24043257](#).

Van Huysse, James W; Dostanic, Iva; Lingrel, Jerry B.; Hou, Xiaohong; Wu, Hengwei (2011). **Hypertension from chronic central sodium chloride in mice is mediated by the ouabain-binding site on the Na,K-ATPase α_2 -isoform**. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 301(5): H2147-53. PMID:[21856907](#).

Wang, Youfa; Wang, Qiong Joanna (2004). **The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: new challenges of the old problem**. Archives of internal medicine. 164(19): 2126–2134. PMID:[15505126](#).

Welch, William J. (2008). **Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction**. Hypertension. 52(1): 51–56. PMID:[18474831](#).

Whitesall, Steven E.; Hoff, Janet B.; Vollmer, Alan P.; D'Alecy, Louis G. (2004). **Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods**. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 286(6): H2408-15. PMID:[14962829](#).

Wilcox, Christopher S.; Pearlman, Adam (2008). **Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides**. Pharmacological reviews. 60(4): 418–469. PMID:[19112152](#).

Wu, Jing; Thabet, Salim R.; Kirabo, Annet; Trott, Daniel W.; Saleh, Mohamed A.; Xiao, Liang; Madhur, Meena S.; Chen, Wei; Harrison, David G. (2014). **Inflammation and mechanical stretch promote aortic stiffening in hypertension through activation of p38 mitogen-activated protein kinase**. Circulation research. 114(4): 616–625. PMID:[24347665](#).

Wynne, Brandi M.; Labazi, Hicham; Tostes, Rita C.; Webb, R. Clinton (2012). ***Aorta from angiotensin II hypertensive mice exhibit preserved nitroxyl anion mediated relaxation responses.*** Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society. 65(1): 41–47. PMID:[21767645](#).

Xi, X. P.; Graf, K.; Goetze, S.; Fleck, E.; Hsueh, W. A.; Law, R. E. (1999). ***Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells.*** Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 19(1): 73–82. PMID:[9888869](#).

Xu, Jiang; Carretero, Oscar A.; Liao, Tang-Dong; Peng, Hongmei; Shesely, Edward G.; Xu, Junxiao; Liu, Thomas S.; Yang, James J.; Reudelhuber, Timothy L.; Yang, Xiao-Ping (2010). ***Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension.*** American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 299(5): H1328-38. PMID:[20833959](#).

Yagi, Shusuke; Akaike, Masashi; Aihara, Ken-ichi; Ishikawa, Kazue; Iwase, Takashi; Ikeda, Yasumasa; Soeki, Takeshi; Yoshida, Sumiko; Sumitomo-Ueda, Yuka; Matsumoto, Toshio; Sata, Masataka (2010). ***Endothelial nitric oxide synthase-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via reduced oxidant injury.*** Hypertension. 55(4): 918–923. PMID:[20194307](#).

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schema, Arterieller Druckpuls.....	2
Abbildung 1-2: Schema, Angiotensin-II Bildung	5
Abbildung 1-3: Schema, Erweitertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	7
Abbildung 1-4: Schema, Aldosteronsynthese.....	8
Abbildung 2-1: Telemetrieinheit, PhysioTel® PA-C10, Copyright: DSI	21
Abbildung 2-2: Druckpuls einer C57BL/6J Maus während Basismessung	22
Abbildung 2-3: Schema, Datenaufzeichnungsplan	23
Abbildung 2-4: Osmotische Minipumpe, Original und Schema, Copyright: ALZET	26
Abbildung 2-5: Ventrikelpräparation zur Gewichtsbestimmung.....	29
Abbildung 2-6: Histologische Schnitte eines Herzen in verschiedenen Färbungen.....	30
Abbildung 2-7: Exemplarischer Vergleich zweier repräsentativer Septen in der PSR-Färbung	30
Abbildung 2-8: Präparation der thorakalen Mauseorta	33
Abbildung 2-9: Schema, Aortenringe, eingehängt in zwei Drahttriangeln	33
Abbildung 2-10: Aufbau Organbad und Myograph	33
Abbildung 2-11: Schema, Vereinfachtes Funktionsprinzip des FACS	35
Abbildung 2-12: Beispiel für Dot-Plot Diagramm.....	36
Abbildung 3-1: Dot-Plot Diagramm der FACS-Messung. Links: C57BL/6J, rechts: Rag-1 ^{-/-}	39
Abbildung 3-2: Balkendiagramm, Durchschnittliche Körpergewichte	41
Abbildung 3-3: X-Y Diagramm, Darstellung der körperlichen Aktivität als 12h-Mittelwerte	42
Abbildung 3-4: Balkendiagramm, Arithmetische Mittelung der körperlichen Aktivität	42
Abbildung 3-5: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität	43
Abbildung 3-6: X-Y Diagramm, Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte	44
Abbildung 3-7: X-Y Diagramm, Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage.....	44
Abbildung 3-8: X-Y Diagramm, Delta Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte im.	45
Abbildung 3-9: X-Y Diagramm, Delta Herzfrequenz als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage	45
Abbildung 3-10: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der Herzfrequenz im Gruppenvergleich	46
Abbildung 3-11: Balkendiagramm, Arithmetische Mittelung Herzfrequenz	47
Abbildung 3-12: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. HF	48
Abbildung 3-13: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. MAP	48
Abbildung 3-14: Balkendiagramm, Mittlere Herzfrequenz des jeweiligen Aktivitätsclusters, Basis ..	50
Abbildung 3-15: Balkendiagramm, Mittlere Herzfrequenz des jeweiligen Aktivitätsclusters, Ang-II..	50
Abbildung 3-16: X-Y Diagramm, MAP als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte	51
Abbildung 3-17: X-Y Diagramm, MAP als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage.....	51
Abbildung 3-18: X-Y Diagramm, Delta MAP als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte	52
Abbildung 3-19: X-Y Diagramm, Delta MAP als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage.....	52
Abbildung 3-20: Balkendiagramm, Arithmetische 12h-Mittel des MAP	53
Abbildung 3-21: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf des MAP	54
Abbildung 3-22: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. MAP, Basis.....	55
Abbildung 3-23: X-Y Diagramm, Zirkadianer Verlauf der körperlichen Aktivität vs. MAP, Ang-II	55

Abbildung 3-24: Balkendiagramm, Mittlerer MAP des jeweiligen Aktivitätsclusters, Basis.....	56
Abbildung 3-25: Balkendiagramm, Mittlerer MAP des jeweiligen Aktivitätsclusters, Ang-II	56
Abbildung 3-26: X-Y Diagramm, Systolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Nächte	57
Abbildung 3-27: X-Y Diagramm, Systolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage...	57
Abbildung 3-28: X-Y Diagramm, Diastolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage..	58
Abbildung 3-29: X-Y Diagramm, Diastolischer Blutdruck als 12h-Mittelwerte der jeweiligen Tage..	58
Abbildung 3-30: Balkendiagramm, Delta ΔP_{sys} & ΔP_{Dia}	59
Abbildung 3-31: X-Y Hill-Kurve, Reaktion der Aortenringe auf Acetylcholin im Myographen	60
Abbildung 3-32: X-Y Hill-Kurve, Reaktion der Aortenringe auf Nitroglyzerin im Myographen	60
Abbildung 3-33: Berechnete Parameter der Hill Kurven	62
Abbildung 3-34: Balkendiagramm, Mediafläche der Aorta [Mittelwert +/- SEM]	63
Abbildung 3-35: Histologie Aorta	64
Abbildung 3-36: Balkendiagramm, Ventrikelgewicht / Körpergewicht	65
Abbildung 3-37: Balkendiagramm, Δ [Ventrikelgewicht / Körpergewicht]	65
Abbildung 3-38: Balkendiagramm, PSR Score [Mittelwert +/- SEM].....	66

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Angiotensin-II Rezeptoren.....	6
Tabelle 1-2: Cluster of Differentiation	12
Tabelle 1-3: T-LymphozytenSubtypen	12
Tabelle 2-1: Eingesetzte Primasen	19
Tabelle 2-2: PCR-Temperatur-Zyklen	19
Tabelle 2-3: Erwartete Länge der amplifizierten Genabschnitte	19
Tabelle 2-4: Übersicht der angefärbten Oberflächenmarker.....	36
Tabelle 2-5: Sender-Kenndaten [81]	21
Tabelle 2-6: Ausgabe der Rohdaten aus Gold Acquisition 4.31 in eine MS Excel Tabelle	23
Tabelle 2-7: Kenndaten der osmotischen Pumpe	27
Tabelle 2-8: PSR-Score.....	31
Tabelle 2-9: Zusammensetzung des Organbades	32
Tabelle 2-10: Konzentrationsstufen im Organbad.....	34
Tabelle 3-1: OP-Statistik.....	40
Tabelle 3-2: Grenzwerte der benutzten Aktivitätscluster [Counts/min]	49
Tabelle 3-3: MAP-Niveau Veränderung bei Ang-II Infusion	53

10. Danksagung

Ich danke Herrn *Prof. Dr. med. Heimo Ehmke* für die Überlassung dieses Themas, die Möglichkeit zur Durchführung des Projektes und zum Schreiben dieser Dissertation in seinem Institut. Dabei danke ich Ihm auch besonders für die persönlichen Ermutigungen zur selbstbewussten Darstellung meiner erhobenen Daten.

Als einer der ersten betreuten Doktoranden von Frau *Dr. med. Anika Seniuk* danke ich ihr für die allzeit fürsorgliche Unterstützung meiner Arbeit im Labor, für das dabei entgegengebrachte Vertrauen und für das Korrekturlesen dieser Dissertation. Durch die gemeinsame Zeit im Institut habe ich viel Spaß an der Forschung gewonnen. Auch weil Themen abseits der Labortätigkeit ihren Platz gefunden haben bedanke ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank geht an *Hartwig Wiebold* aus dem Forschungslabor der Klinik für allgemeine und interventionelle Kardiologie des UKE Hamburg für die Hilfe und Durchführung der Gefäßrelaxationsmessungen. Für die Hilfe bei der phänotypischen Untersuchung der Versuchstiere durch FACS danke ich Herrn *Dr. rer. nat. Hans Joachim Paust* aus dem Institut für Nephrologie des UKE Hamburg.

Einen ganz besonderer Dank für die vielen Genotypisierungen und Hilfen bei molekularbiologischen Tätigkeiten richte ich an *Frau Telse Kock, Frau Margrit Hölzel und Frau Annett Hasse*. Zum Problemlösungs- und Terminmanagement konnte ich mich jederzeit an *Frau Claudia Kollien* wenden. Ich bedanke mich auch hier ganz herzlich! Falls es Probleme technischer Natur gab stand mir *Herr Dipl.-Ing. Peter Bassalay* immer stets zur Verfügung. Für die netten und gesprächigen Mittags-, Büro- und Kaffeepausen, sowie auch für naturwissenschaftliche Diskussionen danke ich ebenfalls *Charly, Marisa, Mirco, Alex, Christiane und Robert*. Ich erinnere mich gerne an die Forschungszeit zurück und bin froh in diesem Institut meine Dissertation angefertigt zu haben!

Ein besonderes Dankeschön spreche ich auch meinem Kommilitonen *Fabian* sowohl für die vielen gemeinsamen kreativen und motivationsfördernden Treffen als auch für die dabei stattgefundenen spannenden Computerspiel-Duelle während der Schreibphase unserer beider Doktorarbeiten aus.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten & Familie

Name: Jonas Leonhard Thiele

Geburtsdatum und -ort: 09. September 1990 in Hamburg

Eltern: Stadtbaudirektor i.R. Dipl.-Ing. Wilhelm Heinrich Thiele, Architekt u. Stadtplaner
Gundula Thiele, Postbeamtin a.D.

Geschwister: Bruder: Dipl.-Ing. Oliver Thiele, Bauingenieur
Schwester: Carla Christina Dähne, Oberstufenlehrerin

Schule

1996 – 2000 Grundschule

06/2009 Abitur an der Lauenburgischen Gelehrtenschule Ratzeburg

Hochschule

10/2009 Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin am UKE Hamburg

09/2011 1. Ärztliche Prüfung (Physikum)

10/2014 2. Ärztliche Prüfung

12/2015 3. Ärztliche Prüfung, Approbation

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Jonas Leonhard Thiele