

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Effekte von Hypoxie/Reoxygenierung auf kortikale Mikrogefäße der Niere –
Untersuchungen im Modell des akuten Nierenschnittes

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tamara Margit Jutta Pahlitzsch

aus *Berlin*

Datum der Promotion: 07.12.2018

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Eidesstaatliche Versicherung und Anteilserklärung.....	4
4. Journal Summary List.....	6
5. Publikation	7
6. Lebenslauf	42
7. Publikationsliste	44
8. Danksagung.....	45

1. Zusammenfassung

Einleitung: Hypoxie/Reoxygenierung (H/R) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des akuten Nierenversagens. Wir testeten die Hypothese, dass H/R die Vasoreaktivität afferenter Arteriolen auf Angiotensin II (Ang II) erhöht. Dazu etablierten wir in unserem Labor das innovative *in situ* Modell des akuten Nierenschnitts und verglichen die Ergebnisse mit Studien an isolierten afferenten Arteriolen, um den Einfluss des umliegenden Gewebes auf die Gefäßfunktion zu untersuchen.

Methoden: Es wurden 200 µm dünne Nierenschnitte hergestellt. Zur Prüfung der Viabilität erfolgten Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen. Die Gefäße wurden mittels Differential-Interferenzkontrast auf einem invertierten Mikroskop dargestellt. Zur Charakterisierung der Vasoreaktivität afferenter Arteriolen wurden vasoaktive Substanzen appliziert. Für Versuche nach H/R wurden die Schnitte in eine Hypoxiekammer (95% N₂, 5% CO₂) für 30, 60 oder 90 Minuten transferiert und für 10 oder 20 Minuten reoxygeniert. Anschließend wurde die Ang II-Antwort untersucht. Versuche mit isolierten afferenten Arteriolen erfolgten unter Kontrollbedingungen sowie nach 60 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung. Zudem wurden die Veränderungen von zytosolischen Kalzium-Transienten sowie die mRNA-Expression von Ang II-Rezeptoren und der NADPH-Oxidase in isolierten Arteriolen bestimmt. Die Messung der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) erfolgte in Nierenschnitten.

Ergebnisse: H/R verursachte nekrotische Veränderungen. Bolusapplikationen von Ang II (10⁻⁷ mol/l), Norepinephrin (10⁻⁵ mol/l), Endothelin-1 (10⁻⁵ mol/l) und Adenosintriphosphat (10⁻⁵ mol/l) führten zu einer maximalen Vasokonstriktion afferenter Arteriolen auf 44,5 ± 2,8 %, 50,0 ± 2,2%, 45,3 ± 2,6% und 74,1 ± 1,8 % des basalen Durchmessers. Eine Inhibierung der NO-Synthetase mit L-NAME (10⁻⁴ mol/l) verstärkte die Ang II-vermittelte Vasokonstriktion (32,3 ± 2,3 %). H/R verstärkte die Ang II-Antwort afferenter Arteriolen im Vergleich zu Kontrollen. Die Kalziumtransienten waren allerdings nicht verändert. Tempol hob den Effekt von H/R auf die Ang II-Antwort auf. H/R erhöhte zudem signifikant die mRNA Expression von NOX2 und verringerte die von NOX4, beeinflusste aber nicht die Ang II-Rezeptoren. Die SOD-Aktivität war signifikant verringert.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der HE-Färbungen und der funktionellen Testungen mit vasoaktiven Substanzen zeigen, dass das *in situ* Modell des akuten Nierenschnitts für die Untersuchung afferenter Arteriolen geeignet ist. Die verstärkte Gefäßantwort auf Ang II nach H/R weist darauf hin, dass ein erhöhter renaler Gefäßwiderstand mit in der Folge vermindertem renalen

ZUSAMMENFASSUNG

Blutfluss an der multifaktoriellen Genese des akuten Nierenversagens beteiligt sein könnte. Dieser Effekt trat allerdings unabhängig vom umgebenden Gewebe auf. Oxidativer Stress und erhöhte Kalziumsensitivität des kontraktilen Apparates könnten mögliche Mechanismen sein, die zur der beobachteten erhöhten Ang II-Antwort nach H/R führen.

2. Abstract

Introduction: Hypoxia/re-oxygenation (H/R) plays an important role in the pathogenesis of acute kidney injury. We hypothesize that H/R increases the vasoreactivity of afferent arterioles to angiotensin II (Ang II), which might promote development of kidney injury. To test the hypothesis, we compared an innovative *in situ* model of live kidney slices with isolated afferent arterioles to assess the impact of surrounding tubules on microvascular function.

Methods: Hematoxylin and eosin staining (H&E) was used to estimate viability of live kidney slices. For functional experiments, kidney slices (200 μm) of *C57BL/6* mice were prepared. Afferent arterioles were visualized by differential interference contrast applied to an inverted microscope. To characterize vessel reactivity in this model, vasoactive substances were administered. For H/R experiments, the slices were transferred into a hypoxia chamber (95% N_2 , 5% CO_2) for 30, 60 or 90 minutes and re-oxygenated for 10 or 20 minutes. Isolated arterioles were either subjected to control conditions or 60 minutes hypoxia and 10 minutes reoxygenation. Changes of cytosolic calcium transients and mRNA expression of Ang II-receptors and NADPH oxidase were studied in isolated afferent arterioles. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured in live slices.

Results: H/R resulted in enhanced necrosis of the tissue compared to control conditions. Afferent arterioles responded to the bolus application of Ang II (10^{-7} mol/l), norepinephrine (10^{-5} mol/l), endothelin-1 (10^{-5} mol/l) and ATP (10^{-5} mol/l) with a maximum constriction to 44.5 ± 2.8 %, 50.0 ± 2.2 %, 45.3 ± 2.6 % and 74.1 ± 1.8 , respectively. Inhibition of the NO-synthesis by L-NAME (10^{-4} mol/l) significantly augmented the vasoconstriction to Ang II (32.3 ± 2.3 %). H/R increased the Ang II response in live slices and isolated afferent arterioles compared to control conditions. However, calcium transients did not change. Tempol prevented the H/R effect on Ang II responsiveness. H/R further significantly increased NOX2 and decreased NOX4 mRNA expression, but did not influence Ang II receptor expression. SOD activity was significantly diminished.

Conclusion: H&E and functional testing with vasoactive substances indicates the usefulness of the *in situ* model for the investigation of afferent arteriolar function. The increased response to Ang II in H/R suggests that an increased renal resistance contributes to reduced renal perfusion as one component in the multifactorial genesis of acute kidney injury. However, this effect occurred independently from the surrounding tissue. Oxidative stress and increased calcium sensitivity of the contractile apparatus might be possible mechanisms resulting in increased Ang II response after H/R.

3. Eidesstaatliche Versicherung und Anteilserklärung

Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Tamara Pahlitzsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Hypoxie/Reoxygenierung auf kortikale Mikrogefäße der Niere – Untersuchungen im Modell des akuten Nierenschnittes“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Pahlitzsch TM, Liu ZZ, Al-Masri A, Braun D, Dietze S, Persson PB, Schunck WH, Blum M, Kupsch E, Ludwig M, Patzak A.: Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017:ajprenal 00252 2017. (Impact Factor von 3,611, Eigenfaktor von 0,022770)

Experimenteller Teil:

- Konzeption des Projektes unter Anleitung des Doktorvaters und Etablierung des *in situ* Modells des akuten Nierenschnitts
- Vorbereitung der experimentellen Arbeiten einschließlich der Herstellung von Lösungen und Herstellung der Nierenschnitte
- Selbstständige Durchführung aller Messungen der afferenten Arteriolen im Nierenschnitt unter Kontrollbedingungen und nach Hypoxie/Reoxygenierung
- Festlegung und Optimierung der Protokolle

Auswertung und Statistik

- Messung und Aufarbeitung der Daten zu Konstriktionsverläufen der afferenten Arteriolen unter Kontrollbedingungen und nach Hypoxie/Reoxygenierung und graphische Darstellung der Ergebnisse
- Durchführung statistischer Tests und Analyse und Diskussion der Ergebnisse mit den Ko-Autoren

Arbeit am Manuskript

- Literaturrecherche, Konzeption, Ausformulierung und kritische Überarbeitung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren
- Bearbeitung des Manuskripts sowie Planung und Durchführung zusätzlicher Versuche im Rahmen der Revision

Präsentation der Forschungsergebnisse vor wissenschaftlichem Publikum auf der 96. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (Vortrag) sowie dem Experimental Biology Kongress 2017 (Posterpräsentation)

Unterschrift der Doktorandin

JOURNAL SUMMARY LIST

4. Journal Summary List

Das American Journal of Physiology – Renal Physiology hatte im Jahr 2016 einen Impact Factor von 3,611 und einen Eigenfaktor von 0,022770. Das Journal lag im Bereich „Physiology“ auf Platz 17 von 84 und somit unter den besten 30 Prozent.

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“PHYSIOLOGY”** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 84 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	PHYSIOLOGICAL REVIEWS	25,952	27.312	0.033220
2	Annual Review of Physiology	8,818	11.115	0.012360
3	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	7,278	10.391	0.008040
4	Comprehensive Physiology	2,641	6.949	0.012280
5	PHYSIOLOGY	2,946	6.076	0.006070
6	CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY	8,744	5.104	0.014190
7	Acta Physiologica	3,911	4.867	0.009770
8	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	713	4.769	0.000630
9	JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON	48,567	4.739	0.047830
10	EXERCISE AND SPORT SCIENCES REVIEWS	2,674	4.431	0.003780
11	International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity	7,028	4.396	0.020720
12	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY	13,082	4.281	0.018040
13	JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY	7,714	4.200	0.009920
14	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	20,249	4.142	0.025980
15	Frontiers in Physiology	7,664	4.134	0.031330
16	JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY	17,632	4.080	0.023490
17	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-RENAL PHYSIOLOGY	16,787	3.611	0.022770
18	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY	16,627	3.602	0.019200
19	JOURNAL OF BIOLOGICAL RHYTHMS	2,617	3.500	0.004220
20	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY	14,393	3.468	0.020340
21	JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY	42,740	3.351	0.030480

Selected JCR Year: 2016; Selected Categories: "PHYSIOLOGY"

1

Quelle: ISI Web of KnowledgeSM
 (https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2016/ISI-WEB-Liste-Kategorie-Physiology.pdf; abgerufen am 12.01.2018)

5. Publikation

Decision made for F-00252-2017R1

06.01.18, 18:16

Decision made for F-00252-2017R1

ajprenal@msubmit.net

Gesendet: Dienstag, 24. Oktober 2017 20:02

An: Pahlitzsch, Tamara Margit Jutta

Dear Mrs. Pahlitzsch:

A decision for F-00252-2017R1, "Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II" for which you are listed as co-author, has been sent to the corresponding author. That letter is below. Contributing authors are: Tamara Pahlitzsch, Zhi Zhao Liu, Amira Al-Masri, Diana Braun, Stefanie Dietze, Pontus Persson, Wolf-Hagen Schunck, Maximilian Blum, Eckehardt Kupsch, Marion Ludwig, and Andreas Patzak

Anita T. Layton
Deputy Editor
American Journal of Physiology - Renal Physiology
Robert R. and Katherine B. Penn Professor of Mathematics
Professor of Biomedical Engineering
Duke University

Subject: F-00252-2017R1 Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II Accepted for publication

Dear Mrs. Liu:

CC: Tamara Margit Pahlitzsch, Amira Al-Masri, Diana Braun, Stefanie Dietze, Pontus B. Persson, Wolf-Hagen Schunck, Maximilian Blum, Eckehardt Kupsch, Marion Ludwig, Andreas Patzak

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted and "Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II" (F-00252-2017R1) will be published online as an Article in Press, within approximately two weeks, assuming all files are in order.

PLEASE NOTE THAT YOUR MANUSCRIPT WILL BE PUBLISHED IN *AiPS* EXACTLY AS SUBMITTED, INCLUDING SPELLING OF AUTHOR NAMES AS PROVIDED IN THE METADATA OF THE MANUSCRIPT RECORD.

Thank you for your continued interest in the journal and congratulations to you and your colleagues on such an excellent study.

Regards,

Anita T. Layton
Deputy Editor
American Journal of Physiology - Renal Physiology
Robert R. and Katherine B. Penn Professor of Mathematics
Professor of Biomedical Engineering
Duke University

Pahlitzsch TM, Liu ZZ, Al-Masri A, Braun D, Dietze S, Persson PB, Schunck WH, Blum M, Kupsch E, Ludwig M, Patzak A.: Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017:ajprenal 00252 2017

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00252.2017>

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7. Publikationsliste

Publikationen

Pahlitzsch TM, Liu ZZ, Al-Masri A, Braun D, Dietze S, Persson PB, Schunck WH, Blum M, Kupsch E, Ludwig M, Patzak A.: Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017;ajprenal 00252 2017 (Impact Factor 3,611)

Braun D, Dietze S, **Pahlitzsch TMJ**, Wennysia IC, Persson PB, Ludwig M, Patzak A. Short-term hypoxia and vasa recta function in kidney slices. *Clin Hemorheol Microcirc* 2017;67:475-84. (Impact Factor: 1,679)

Liu ZZ, Mathia S, **Pahlitzsch T**, Wennysia IC, Persson PB, Lai EY, Högner A, Xu MZ, Schubert R, Rosenberger C, Patzak A. Myoglobin facilitates angiotensin II-induced constriction of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017;312:F908-F16 (Impact Factor 3,611)

Pahlitzsch TMJ, Helbig ET, Sarioglu N, Hinkson L, von Weizsacker K, Henrich W. Novel Insights in Fetal Cardiomyopathy due to in utero Herpes Simplex Virus Infection. *Fetal Diagn Ther* 2017;42:236-9. (Impact Factor: 2,59)

Vorträge, Poster

Pahlitzsch TM, Zich C, Henrich W, Weichert A.: Die Bedeutung falschnegativer Ergebnisse in der nicht-invasiven pränatalen Diagnostik. 28. *Deutscher Kongress für Perinatale Medizin* (Poster).

Pahlitzsch TM, Braun D, Persson PB, Ludwig M, Patzak A. Hypoxia/re-oxygenation increases the response of afferent arterioles to angiotensin II - Investigation in mouse kidney slices. *Experimental Biology, Chicago, USA 2017* (Poster) - gefördert durch ein Reisestipendium der Freunde und Förderer der Charité

Pahlitzsch TM, Braun D, Persson PB, Ludwig M, Patzak A. Functional effects of hypoxia/re-oxygenation on the angiotensin II response of afferent arterioles in the live kidney slice model. 96. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft* (Vortrag) - gefördert durch ein Reisestipendium der GSK-Stiftung

8. Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andreas Patzak, danke ich für die Vergabe des Themas, die gründliche Einarbeitung in die wissenschaftliche Arbeit und die Begleitung des gesamten Projekts. Ich möchte mich besonders für die zuverlässige und herzliche Betreuung und Offenheit bei Fragen, Problemen aber auch neuen Ideen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Pontus B. Persson danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu forschen.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für ihre stete Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen, aber auch für die schöne gemeinsame Zeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Marion Ludwig für ihre Korrekturen und Verbesserungsvorschläge für diese Arbeit und die große Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

Den Ko-Autoren danke ich herzlich für ihre wissenschaftlichen und praktischen Arbeiten im Rahmen des gemeinsamen Projekts.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, Pamela und Matthias Pahlitzsch, und meiner Großmutter, Hertha Pahlitzsch, für ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr großes Vertrauen in mich. Meinen Schwestern Karolina und Sonja Pahlitzsch danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind. Vincent Casteleyn danke ich für seine ausdauernde Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit, seinen Optimismus und für seine Liebe.