

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

DISSERTATION

Hypoxie und Nierengefäßfunktion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Diana Braun

aus Karlsburg

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Abstract (Deutsch)	2
Abstract (Englisch)	4
Einführung	5
Methodik	8
Ergebnisse	13
Diskussion	17
Literaturverzeichnis	22
Eidesstattliche Versicherung	26
Ausgewählte Publikationen	28
Publikation 1	28
Publikation 2	40
Publikation 3	51
Lebenslauf	61
Komplette Publikationsliste	62
Danksagung	63

Abstract (Deutsch)

Für die Pathophysiologie des akuten Nierenversagens (AKI) ist der Ischämie/Reperfusionsschaden (IRI) von großer Bedeutung. Ischämie/Reperfusion ist mit Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) des Nierengewebes verbunden. Aufgrund der organspezifischen mikrovaskulären Architektur sowie des heterogenen Energiebedarfs gibt es in der Niere vulnerable Bereiche hinsichtlich der Sauerstoffversorgung. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese geprüft, dass H/R die dilatative und konstriktive Funktion der Nierengefäße beeinträchtigt, und dass dies den IRI und damit das Entstehen eines AKI begünstigt. Es wurden sowohl große Leitungsgefäße der Rattenniere (renale interlobare Gefäße (ILA)) als auch Mikrogefäße des Rattennierenmarks (descendierende Vasa recta) und der Mausnierenrinde (afferente Arteriolen) verwendet. ILA wurden mittels Drahtmyografie untersucht. Die Mikrogefäße wurden als isolierte Gefäße oder mittels Videomikroskopie lebender Nierenschnitte (*in situ* Modell) untersucht. Die Acetylcholin(ACh)-induzierte Vasodilatation der ILA war nach H/R verringert. Eine Inhibition der dilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxidsynthasen, Cyclooxygenasen oder des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors (EDHF) konnte diesen Effekt nicht aufheben. Ein Einfluss von Superoxiden auf die Vasodilatation nach H/R wurde ebenso wie eine veränderte Gefäßsteifheit als Ursache beeinträchtigter Vasodilatation ausgeschlossen. Die Antwort auf Natriumnitroprussid (SNP), einem Stickstoffmonoxid-donor war nach H/R ebenfalls vermindert. Dies deutet auf einen endothelunabhängigen Mechanismus verminderter Vasodilatation hin, der in den glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert ist. Eine geringere Sensitivität bei der Vasodilatation auf Sildenafil (PDE5-Inhibitor) und eine verminderte Konzentration von cGMP in den ILA nach H/R weisen auf eine Störung des cGMP-Metabolismus hin. Die Hemmung der löslichen Guanylylzyklase (sGC) dagegen hob den H/R-Effekt auf. Die Ergebnisse deuten auf eine H/R-induzierte Fehlfunktion der sGC hin. Untersuchungen der Gefäßantwort auf Vasokonstriktoren in afferenten Arteriolen in Nierenschnitten zeigten eine verstärkte Konstriktion auf Angiotensin II (Ang II) nach H/R. Die Stärke der Antwort war nach 30, 60, oder 90 min und 10 min Reoxygenierung im Nierenschnitt ähnlich. Dagegen nahm sie bei 20 min Reoxygenierungszeit mit der Hypoxiedauer zu. In diesen experimentellen Modellen spielt vermutlich oxidativer Stress eine Rolle, denn die NADPH-Oxidase-2-mRNA war erhöht und die Superoxiddismutase(SOD)aktivität im Nierenschnitt verringert. Zudem hob Tempol, ein SOD-Mimetikum, die Unterschiede in der Antwort auf Ang II auf. Descendierende Vasa recta-Antworten auf Ang II waren nach 90 min Hypoxie und 10 min Reoxygenierung im

Vergleich zur Kontrolle verstärkt. Die Ergebnisse dieser Studien weisen auf einen erhöhten Tonus großer und kleiner Gefäße in der Niere, infolge verstärkter Antwort auf Ang II, sowie reduzierter Vasodilatation nach H/R, hin. Dies kann für den IRI und die AKI-Entstehung von entscheidender Bedeutung sein.

Abstract (Englisch)

The ischemia reperfusion injury (IRI) is an important pathophysiological factor in the development of acute kidney injury (AKI). IRI goes along with hypoxia and re-oxygenation (H/R) of the renal parenchyma. Kidney's unique microvascular architecture and the heterogenic oxygen demand make the medullary zone very vulnerable to reduction in oxygen supply. In this study, it was hypothesized that the dilator and constrictor function of renal vessels are compromised by H/R, thereby promoting IRI and AKI. Rat renal interlobar arteries (ILA), rat descending vasa recta, and mouse afferent arterioles were investigated. ILA were studied by using small vessel wire myography. Video microscopy was applied for testing function of isolated arteriolar vessels or vessels in living slice kidney model (*in situ* model). In ILA, H/R impaired the acetylcholine(ACh)-induced vasodilatation. The inhibition of the nitric oxide synthases, cyclooxygenases or of the endothelial derived hyperpolarizing factors (EDHF) did not prevent the H/R effect. An influence of superoxide to the impaired vasodilatation after H/R as well as changes in vessel stiffness could be excluded as causative for impaired vasodilatation. The impaired endothelium-independent vasodilatation to sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide donor, suggests an endothelial-independent mechanism, located in vascular smooth muscle cells. The vasodilatation to sildenafil was diminished and the concentration of cGMP in ILA was reduced after H/R, suggesting disturbed cGMP metabolism. Inhibition of soluble guanylyl cyclase (sGC) prevented the H/R-effect, indicating a prominent role of sGC after H/R. In arterioles of kidney slices, angiotensin II(Ang II)-responses were increased after H/R. Oxidative stress may be involved in the increased reactivity, because superoxiddismutase(SOD)-activity was reduced and NADPH-oxidase-2-mRNA-expression was increased. Furthermore, tempol, a SOD-mimetic, prevented the H/R effect in afferent arterioles. In descending vasa recta, the Ang II-induced vasoconstriction was significant increased at 90 min of hypoxia and 10 min of re-oxygenation compared to control conditions in living kidney slices. In conclusion, an enhanced tone of renal arteries and microvessels due to increased reactivity to Ang II combined with impaired vasodilatation may contribute to the IRI in AKI.

Einführung

Akutes Nierenversagen, Epidemiologie und Ursachen

Bei dem akuten Nierenversagen (AKI) handelt es sich um eine rapide Verschlechterung der Nierenfunktion charakterisiert durch eine Erhöhung des Serumkreatinins und Verminderung der Urinausscheidung. Diagnostische Kriterien sind immer wieder weiterentwickelt worden und finden ihren Ausdruck in Schweregradeinteilungen wie KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes)¹ und RIFLE (the risk, injury, failure, loss, and end-stage renal disease classification).^{2,3} AKI ist eines der häufigsten renalen Erkrankungen, welches bei 7 % hospitalisierter Patienten auftritt⁴ und trotz verbesserter Diagnostikmöglichkeiten mit einer Mortalitätsrate von 40 bis 60 % verbunden ist.^{5,6} Bisher existieren noch keine ausreichenden Therapiemöglichkeiten, was auf den Mangel an Wissen über die Pathophysiologie des AKI zurückzuführen ist. Die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines AKI findet über ein komplexes Zusammenspiel von tubulären Schädigungen, Inflammation und Veränderungen in der renalen Hämodynamik statt und kann zu einem chronischen Nierenversagen führen. Als eine Hauptursache für die Entstehung des AKI wird der Ischämie/Reperfusionsschaden (IRI) der Niere beschrieben. IRI tritt infolge einer ischämischen Phase und nachfolgenden unzureichenden renalen Reperfusion, zum Beispiel aufgrund von Nierentransplantationen, Gefäß- oder herzchirurgischen Eingriffen, kontrastmittel-induzierter Nephropathie, Sepsis und/oder Schock auf.^{2,7,8} Im Vergleich zu anderen Organen führt eine Ischämie in der Niere zu einer verzögerten Wiederherstellung des renalen Blutflusses bei Reperfusion bis hin zum „No-Reflow“-Phänomen.^{9,10} Nach einer renalen Ischämie konnte eine Reduktion des renalen Blutflusses auf 50 % beobachtet werden.¹¹ Beim „No-Reflow“-Phänomen gibt es zusätzlich noch morphologische Veränderungen in der Mikrozirkulation, insbesondere die Bildung von Mikrothromben, die zu erheblicher Beeinträchtigung der Gewebeversorgung führen.¹²⁻¹⁵

Renale Gefäßarchitektur und Sauerstoffpartialdrücke

Aufgrund ihrer mikrovaskulären Architektur, verbunden mit einem hohen Sauerstoffverbrauch durch die tubuläre Salz-Wasserreabsorption ist die Niere im Bereich des äußeren Nierenmarks sehr anfällig für einen IRI.¹⁶ Der Sauerstoffpartialdruck der Niere liegt in der Nierenrinde bei 70 mmHg. Im Nierenmark ist der Sauerstoffpartialdruck wesentlich niedriger, im inneren Mark liegt dieser sogar unter 20 mmHg.¹⁷

Mechanismen gestörter Mikrozirkulation bei AKI

Ischämie, die bei der Entstehung des AKI und dem Übergang zum chronischen Nierenversagen eine wesentliche Rolle spielt, aktiviert inflammatorische Systeme, die letztlich mit morphologischen Schädigungen von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen einhergehen können.¹⁸ Ausgelöst wird dies durch eine Verstopfung der Mikrogefäße durch Leukozyten, Blutplättchen und Erythrozyten.¹⁹ Die hierdurch ausgelöste endotheliale Dysfunktion trägt zum Ungleichgewicht von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren in den Mikrogefäßen bei.²⁰ Neben der eingeschränkten dilatativen Funktion (Stickstoffmonoxid (NO), endothelialer hyperpolarisierender Faktor (EDHF)) kommt es zur Freisetzung von konstriktorischen Mediatoren wie Prostaglandinen, Endothelin (ET-1), Angiotensin II (Ang II) und Thromboxan A₂.²¹ Die Interaktion von Ang II und NO hat für den Tonus renaler Gefäße eine große Bedeutung.^{22,23} Ang II-induzierte Kontraktionen sind nach H/R in großen renalen Arterien und auch in den renalen Widerstandsgefäßen (afferente Arteriolen) verstärkt.²⁴ Da Ang II sowohl Konstriktorsignalwege als auch dilatatorische Systeme, wie das NO-System aktiviert, kann dieser H/R-Effekt auch auf der Beeinflussung der Gefäßdilatation beruhen.^{22,23} NO stimuliert die sGC, welche die cGMP-Produktion enzymatisch befördert. Die cGMP-Konzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen führt zur Aktivierung der Proteinkinase G, Phosphorylierung einer Reihe von Kanälen und Enzymen mit der Folge erniedrigter zytosolischer Calciumkonzentration und Gefäßdilatation.²⁵ Quellen für NO sind das Endothel der Nierengefäße, aber auch die tubuläre NO-Produktion, die im Nierenmark einen wesentlichen Einfluss auf den Gefäßtonus hat.²⁵ NOS-Inhibition führt zu Minderdurchblutung und eine durch die Hypoxie ausgelöste Schädigung des Nierenmarks in renalen Ischämie-Modellen.²⁶ Ein ebenso stark diskutierter Mechanismus des beobachteten NO-Defizits in IRI oder H/R ist die Interaktion von NO und reaktiven Sauerstoffspezies bei oxidativem Stress.²⁷ Superoxid, als wesentliches Radikal, reagiert mit NO, was zur Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit und zum Anstieg von zellschädigendem Peroxynitrit führt.²⁸

Herleitung der Fragestellung

Der Effekt von H/R auf die Vasokonstriktion und die Vasodilatation in der Pathophysiologie des IRI wurde bisher nur sehr wenig untersucht. Experimente an isolierten Gefäßen der Maus zeigten eine erhöhte Reaktivität auf Ang II nach H/R in Gegenwart einer physiologischen Noradrenalin(NA)-Konzentration.²⁴ Bisher existieren keine funktionellen Daten über den Effekt von H/R auf vasodilatatorische Systeme in Nierengefäßen, obwohl eine endotheliale Beteiligung beim IRI bereits beschrieben wurde.²⁰ Beeinträchtigungen des NO-Systems der

Prostaglandinproduktion und des EDHF könnten für die hypothetische Verminderung der vasodilatatorischen Antwort nach H/R verantwortlich sein.²⁹ In der Studie von [Publikation 1 (P1)] wurde nun der H/R-Effekt in Gegenwart einer physiologischen NA-Konzentration auf die endothelabhängige und -unabhängige Vasodilatation großer renaler Gefäße untersucht. Es wurde angenommen, dass neben der Verstärkung der Vasokonstriktion nach H/R auch vasodilatatorische Systeme beeinflusst sein können, was zu einer verminderten Vasodilatation renaler Gefäße führt und somit die Entstehung eines IRI und damit eines AKI begünstigt.²⁴

Der Effekt von H/R auf renale Mikrogefäße ist nur exemplarisch untersucht worden. Das betrifft sowohl kortikale als auch medulläre Mikrogefäße. Mikrogefäße des Nierenmarks und -rinde reagieren auf vasoaktive Substanzen, wie Ang II, Adenosin, ET-1, reaktiven Sauerstoffspezien und NO.³⁰⁻³⁴ Metabolische Änderungen bei H/R spielen in vielen Organen eine wichtige Rolle für die Durchblutungsregulation. Mithilfe eines innovativen Modells des lebenden Nierenschnittes wurden Gefäßantworten *in situ* nach H/R analysiert und mit denen von isolierten Gefäßen verglichen. Ziel war es, den Einfluss des die Gefäße umgebenden Nierenparenchyms auf die Gefäßfunktion nach H/R zu bestimmen (Studien [Publikation 2 (P2)] und [Publikation 3 (P3)]). Wir stellten hier die Hypothese auf, dass der Tonus der Gefäße im Nierenmark und der Nierenrinde nach H/R erhöht ist, dabei aber durch die umgebenden Tubuli Metabolite freigesetzt werden, die eine teilweise Kompensation der Konstriktoreffekte bewirken. Die Modulation dieser hypothetischen dilatatorischen Systeme könnte ein Ansatz für die Behandlung oder Prävention des AKI sein.

Methodik

Der Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Vasodilatation renaler interlobärer Gefäße der Ratte

Präparation renaler interlobärer Gefäße und Überprüfung der vaskulären Antwort

Männliche Spargue-Dawley Ratten wurden unter dem Einsatz von Isofluran enthauptet und deren Nieren entnommen. Die renalen interlobären Gefäßen (ILA) wurden präpariert und mittels einem 40 µm dicken Draht in einen Drahtmyografen (Model 410A, DMT, Dänemark) eingespannt. Unter dem Einsatz einer Experimentierlösung (Zusammensetzung siehe [P1: 2.4]) wurde das System unter uneingeschränkter Gaszufuhr mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) auf 37°C erwärmt und anschließend wurde eine Normalisierungsprozedur der Gefäße vorgenommen. Die Lebensfähigkeit der Gefäße wurde mit einer kaliumreichen Lösung (Zusammensetzung siehe [P1: 2.4]) überprüft. Es folgte eine Überprüfung der Endothelfunktion über eine Konzentrations-Wirkungskurve mit ACh (10⁻⁹ bis 10⁻⁵ mol/l) an vorkontrahierten Gefäßen mit Phenylephrin (PE). Die Digitalisierung der Daten fand über das PowerLab System (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) statt.

Messung der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatation

Im Anschluss der Endothelfunktionsüberprüfung wurden die ILA für 60 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂; Kontrolle) oder hypoxischen Gas (95% N₂, 5% CO₂; Hypoxie) begast und einer nicht-konstriktorwirksamen Dosis NA (10⁻⁹ mol/l) ausgesetzt. Nach den 60 min wurde das NA ausgewaschen und eine Reoxygenierung für 10 min mit Carbogen vorgenommen.

Zur Messung der endothelabhängigen Vasodilatation wurden L-NAME (10⁻⁴ mol/l), Indomethacin (10⁻⁵ mol/l), TRAM34 (10⁻⁶ mol/l), UCL 1684 (10⁻⁷ mol/l) oder ODQ (10⁻⁵ mol/l) während der 60 + 10 min Periode eingesetzt und anschließend eine Konzentrations-Wirkungskurve für ACh (10⁻⁹ bis 10⁻⁵ mol/l) an mit PE vorkontrahierten Gefäßen durchgeführt.

Zur Bestimmung der endothelunabhängigen Vasodilatation wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit Hilfe von Natriumnitroprussid (SNP; 10⁻⁹ bis 10⁻⁴ mol/l) nach der 60 + 10 min Periode an vorkontrahierten Gefäßen mit PE erstellt. Währenddessen wurde die Endothelfunktion mittels L-NAME (10⁻⁴ mol/l) und Indometahcin (10⁻⁵ mol/l) systemisch aufgehoben.

Um den Einfluss von cGMP an der NO-induzierten Vasodilatation zu bestimmen wurde an mit PE vorkontrahierten Gefäßen eine Konzentrations-Wirkungskurve mit dem cGMP-Analog 8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cGMP; 10^{-8} bis 3×10^{-4} mol/l) nach der 60 + 10 min Periode durchgeführt. Weiterhin wurden DT-2 (10^{-7} mol/l), ein PKG-Inhibitor, zur Überprüfung cGMP-nachgeschalteter Signalwege oder 4-Hydroxy-TEMPO (Tempol; 10^{-4} mol/l), ein Superoxiddismutasemimetikum, zur Überprüfung oxidativen Stresses während der 60 + 10 min Periode eingesetzt. Eine mögliche Rolle von PDE5, an die Vasodilatation, wurde mit Hilfe einer Sildenafil-Konzentrations-Wirkungskurve (10^{-8} bis 10^{-5} mol/l) nach der 60 + 10 min Periode ermittelt.

Bestimmung der cGMP- und der Superoxidkonzentration in renalen interlobaren Gefäßen

Isolierte ILA wurden nach der Behandlung mit Carbogen oder hypoxischen Gas und dem Einsatz einer nicht-konstriktor wirksamen Dosis NA schockgefroren bzw. während der 60 + 10 min Periode mit Dihydroethidiumbromid (DHE) behandelt und anschließend in tissue tek gefroren. In den schockgefrorenen Gefäßen wurde die cGMP-Konzentration mittels direct cGMP ELISA kit (Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz) bestimmt. Aus den in tissue tek eingebetteten Gefäßen wurden 10 µm dicke Cryoschnitte angefertigt, die mit DAPI behandelt wurden. Die DHE-Fluoreszenz wurde mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M, Software Axiovision 3.0) gemessen.

Messung der Wandsteifheit der Gefäße

Um die mechanischen Eigenschaften der glatten Gefäßmuskelzellen zu bestimmen, wurden isolierte ILA nach der 60 + 10 min Periode mittels Drahtmyografie in 20 µm Schritten gespannt, bis die Wandspannung 4,5 mN/mm betrug. Die einzelnen Kurven wurden der Gleichung:

$$T = T_0 \exp [\beta \cdot (IC - IC_0) / IC_0]$$

T=Wandspannung (mN/mm)

T_0 =Wandspannung bei transmuralen Druck 100 mmHg

IC=Gefäßdurchmesser (mm) bei transmuralen Druck von 100 mmHg

IC_0 =Gefäßdurchmesser (mm)

angepasst, wobei der Parameter „beta“ die Wandsteifheit der Gefäße wiedergibt.

Ermittlung von mRNA-Expressionsdaten mittels qPCR

Für die Erhebung der Expressionsdaten wurde aus isolierten ILA die RNA mittels RNA-Bee-reagent (Biozol, Eching, Deutschland) isoliert und in cDNA mittels High Capacity cDNA RT-Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, #4374966) umgeschrieben. Eine qPCR wurde durch den Lightcycler LC480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und dem StepOnePlus Gerät (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter Anwendung von SYBR Green zur Fluoreszenzdetektion der DNA durchgeführt. Die Expression der mRNA wurde auf 18SrRNA und dem Housekeeping-Gen RPL32 normalisiert. Die relative Expression im Vergleich zur Kontrolle wurde über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet.

Statistik

Unterschiede in der EC_{50} wurden mit dem Wilcoxon-Test für nicht-parametrische Messungen ermittelt. Über den Brunner-Test (ANOVA für wiederholte Messungen und nicht-normalverteilt) wurden Unterschiede in der Konzentration-Antwort-Beziehung ermittelt. Um Gruppenunterschiede in den Expressionsdaten zu ermitteln wurde die ANOVA, gefolgt vom Wilcoxon-Test und eine Korrektur von multiplen Unterschieden angewendet. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angenommen.

Der Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Funktion der Gefäße im Nierenmark und der Nierenrinde

Herstellung lebender Nierenschnitte

Männliche Spargue-Dawley Ratten und männliche C57BL6 Mäuse wurden getötet und deren Nieren entnommen. Die Nieren wurden dekapsuliert, longitudinal halbiert und auf einen Schneideblock des VT1200S Vibratoms (Leica, Nussloch, Deutschland) fixiert. Innerhalb einer Experimentierlösung mit HEPES-Puffer (Zusammensetzung siehe [P2: 2.2]) und bei $4^{\circ}C$ wurden $200 \mu m$ dicke Nierenschnitte angefertigt. Fertige Nierenschnitte wurden in einem Oxygenierungsgefäß gesammelt, welches $37^{\circ}C$ warme Experimentierlösung (Zusammensetzung siehe [P2: 2.2]) enthielt und uneingeschränkt mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast wurde.

Funktionelle Untersuchungen der Gefäße des Nierenmarks und der Nierenrinde nach Hypoxie/Reoxygenierung

Nach ausreichender Sammlung von Nierenschnitten wurden diese für 30, 60 oder 90 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂; Kontrolle) begast oder in die Hypoxiekammer Whitley H135 hypoxic chamber (Meintrup dws Laborgeräte GmbH, Löhden-Holle, Deutschland) überführt. Innerhalb der Hypoxiekammer fand eine Begasung mit 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ statt. Anschließend fand eine Reoxygenierung mit Carbogen für 10 bis 20 min statt.

Die lebenden Nierenschnitte wurden in eine offene Kammer überführt, welche auf 37°C erwärmt wurde und mit Experimentierlösung gefüllt war. Frische mit Carbogen begaste Experimentierlösung wurde ständig mit 4 ml/min in die Kammer eingeführt. Descendierende Vasa recta (Ratte) oder afferente Arteriolen (Maus) wurden mit Hilfe des Axio Observer.Z1 Mikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) identifiziert und Änderungen im Gefäßdurchmesser wurden mit einer Moticam 2000 Kamera und der Motic Images Plus 2.0 Software (Motic Germany, Wetzlar, Deutschland) aufgezeichnet. Die Auswertung der Bilder fand über ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) statt.

Vor der Applikation eines Vasokonstriktors wurde für 60 sec alle 5 sec ein Bild aufgezeichnet. Im Rahmen der Untersuchungen der descendierenden Vasa recta wurde Ang II (10⁻⁷ mol/l) und zur Untersuchung der afferenten Arteriolen Ang II (10⁻⁷ mol/l), NA (10⁻⁵ mol/l), ET-1 (10⁻⁷ mol/l), ATP (10⁻⁴ mol/l) oder L-NAME (10⁻⁴ mol/l) appliziert und anschließend wurde die Pericyten-vermittelte Veränderung des Gefäßdurchmessers in den descendierenden Vasa recta oder die Änderung des Gefäßdurchmessers afferenter Arteriolen gemessen. L-NAME (10⁻⁴ mol/l) wurde 15 min vor Beginn der Messungen in der Lösung inkubiert. Mögliche Veränderungen im Gefäßdurchmesser wurden weitere 4 min aufgezeichnet.

Überprüfung der Überlebensfähigkeit der Nierenschnitte

Nachdem die Schnitte mit Carbogen (Kontrolle) oder in der Hypoxiekammer (Hypoxie) behandelt wurden, wurden diese zur Herstellung von Paraffinblöcken genutzt. Von den Paraffinblöcken wurden 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt und zur Apoptosedetektion mit dem Click-iT[®] Plus TUNEL Assay (Life Technology, Darmstadt, Deutschland) oder zur Nekrosedetektion, mittels H&E-Färbung, eingesetzt. Anschließend wurde mit dem rabbit anti- α -smooth muscle actin Antikörper (1:100; NOVUS Biologicals, Wiesbaden, Deutschland) die

Zellwand von Gefäßen und mit Hoechst 33342 (Milltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) die Zellkerne markiert. Eine Visualisierung der Schnitte fand mit dem Olympus IX81 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) statt.

Isolation von descendierenden Vasa recta und afferenter Arteriolen für qPCR

Descendierende Vasa recta der Ratte und afferente Arteriolen der Maus wurden über die Eisenperfusions-Methode isoliert, die es ermöglichte die mit Eisenpartikel gefüllten vaskulären Strukturen des Nierenmarks und der Nierenrinde von den Tubuli zu trennen.³⁵

Die isolierten descendierenden Vasa recta der Ratte wurden anschließend zur NADPH-Oxidaseenzym-Expressionsanalyse (NOX1, NOX2 und NOX4) und NOS mRNA-Expressionsanalyse (nNOS, eNOS und iNOS) mittels qPCR genutzt. In den isolierten afferenten Arteriolen der Maus wurde mittels qPCR ebenfalls die NADPH-Oxidaseenzym-mRNA bestimmt, als auch die mRNA der Angiotensinrezeptoruntereinheiten 1a, 1b und des Angiotensinrezeptor 2. Die Aufbereitung der RNA bis hin zur qPCR wurde identisch durchgeführt, wie in [P1].

Messung der Superoxiddismutase-Aktivität in lebenden Schnitten der Maus

Die lebenden Nierenschnitte wurden nach der Kontroll- und hypoxischer Behandlung gesammelt und mittels FastPrep FP120 (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) homogenisiert. Zur Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase wurde das Superoxiddismutase Assay Kit von Cayman Chemical (706002) nach Herstellerangaben genutzt. Die Messung des Proteingehaltes wurde mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) durchgeführt.

Statistik

Zur Analyse normalverteilter Gruppen wurde der D'Agostino Pearson Test angewendet und beim Vergleich zweier Gruppen der Mann-Whitney Test. Für die Analyse unabhängiger Gruppen wurde die Ein-Wege ANOVA verwendet. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angenommen.

Ergebnisse

Der Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Vasodilatation renaler interlobärer Gefäße der Ratte

Hypoxie/Reoxygenierung vermindert die Vasodilatation renaler interlobärer Gefäße

Die ILA zeigten nach H/R eine eingeschränkte Vasodilatation auf ACh (EC_{50} : $2,4 \cdot 10^{-7}$ mol/l Kontrolle vs. $4,8 \cdot 10^{-7}$ mol/l Hypoxie; $P=0,004$, [P1] Fig. 2A). Zur Überprüfung, ob endothelabhängige, vasodilatatorische Systeme für den Hypoxie-Effekt verantwortlich sind, wurden L-NAME zur NOS-Inhibition, Indomethacin zur COX-Inhibition, TRAM34 und UCL 1684 zur Inhibition der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.1}$ genutzt ([P1] Fig. 2B; 2C; 2D). Der Hypoxie-Effekt konnte durch die Inhibition dieser Systeme nicht aufgehoben werden. Durch den Einsatz von L-NAME konnte allerdings eine Reduktion des maximalen ACh-Effekts nach H/R festgestellt werden ($62,3 \pm 4,9\%$ Kontrolle vs. $36,2 \pm 5,2\%$ Hypoxie, $P=0,007$ [P1] Fig. 2B). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression der iNOS- (0,45-fach; $P=0,025$) und eNOS-mRNA (0,34-fach; $P=0,026$) nach H/R in den ILA herunterreguliert wurde ([P1] Fig. 2E).

Durch den Einsatz von SNP wurde untersucht, ob Signalwege in der glatten Gefäßmuskulatur unter H/R betroffen sind. H/R führte auch hier zu einer verminderten Vasodilatation der ILA (EC_{50} : $3,3 \cdot 10^{-8}$ mol/l Kontrolle vs. $9,4 \cdot 10^{-8}$ mol/l Hypoxie; $P=0,01$, [P1] Fig. 3A), was auf eine Veränderung in den Signalwegen der glatten Muskulatur nach H/R hindeutet. Eine Untersuchung der Wandsteifheit der ILA zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ([P1] Fig. 3B)

Hypoxie/Reoxygenierung hat keinen Einfluss auf die Superoxidkonzentration in renalen interlobären Gefäßen

Durch den Einsatz von 4-Hydroxy-TEMPO (Tempol) während H/R, wurde der Hypoxie-Effekt nicht aufgehoben (EC_{50} : $3,3 \cdot 10^{-8}$ mol/l Kontrolle vs. $6,8 \cdot 10^{-8}$ mol/l Hypoxie; $P=0,033$, [P1] Fig. 4C). Eine verminderte Vasodilatation der ILA auf SNP blieb weiterhin bestehen. Eine Messung der Superoxidkonzentration in den Ringen der ILA mittels DHE-Fluoreszenz zeigte keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und Hypoxie-Gruppe ([P1] Fig. 4A; 4B). Die Bestimmung der Expression der NADPH-Oxidase-Enzyme NOX1, NOX2 und NOX4 zeigte ebenfalls keine Veränderung nach H/R ([P1] Fig. 4D).

Hypoxie/Reoxygenierung verursacht eine verminderte cGMP-Bioverfügbarkeit in renalen interlobaren Gefäßen

Eine dosisabhängige Inhibition der PDE5 mittels Sildenafil nach H/R führte zu einer verminderten Vasodilatation der ILA im Vergleich zur Kontrolle (EC_{50} : $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l Kontrolle vs. $7,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Hypoxie; $P=0,001$, [P1] Fig. 5A). Der dosisabhängige Einsatz des cGMP-Analogs 8-Br-cGMP zeigte zwischen den beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede ([P1] Fig. 5B). Der Botenstoff cGMP, welcher die Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt ist im Vergleich zur Kontrolle nach H/R verändert ($0,52 \pm 0,04$ pmol/ml Kontrolle vs. $0,29 \pm 0,05$ pmol/ml Hypoxie; $P=0,017$; [P1] Fig. 5C).

Die Inhibition der PKG durch DT-2 konnte die verminderte Vasodilatation der ILA auf SNP nach H/R nicht aufheben (EC_{50} : $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol/l Kontrolle vs. $4,9 \cdot 10^{-8}$ mol/l Hypoxie; $P=0,013$, [P1] Fig. 6A).

sGC-Inhibition hebt den Hypoxie-/Reoxygenierungseffekt auf

Durch den Einsatz von ODQ, einem sGC-Inhibitor wurde der H/R-Effekt aufgehoben. Zwischen der Kontroll- und Hypoxiegruppe gab es keine signifikanten Unterschiede in der dosisabhängigen Vasodilatation auf ACh (Fig. [P1] 6B). Der Effekt von H/R auf die Vasodilatation kann demnach durch eine Fehlfunktion der sGC verursacht sein.

Der Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Funktion der Gefäße im Nierenmark und der Nierenrinde

Signifikant erhöhte Vasokonstriktion von Gefäßen im Nierenmark und der Nierenrinde nach Hypoxie/Reoxygenierung

In den lebenden Nierenschnitten der Ratte wurden im Vergleich zwischen der Carbogenbehandlung von 60 min und der Hypoxiebehandlung von 60 und 90 min keine signifikanten Unterschiede in der Vasokonstriktion der descendierenden Vasa recta auf Ang II detektiert. Allerdings bestand nach H/R von 60 min eine signifikant höhere Vasokonstriktion der descendierenden Vasa recta auf Ang II im Vergleich zur Carbogenbehandlung von 90 min ([P2] Fig. 4).

In den lebenden Nierenschnitten der Maus lösten Ang II, NA, ET-1 und ATP eine Vasokonstriktion afferenter Arteriolen unter Kontrollbedingungen aus ([P3] Fig. 3A). Die

NOS-Inhibition durch L-NAME führte zu einer verstärkten Vasokonstriktion afferenter Arteriolen auf Ang II, im Vergleich zu den Versuchen ohne NOS-Inhibition ([P3] Fig. 3B). Eine maximale Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen wurde nach 90 min Hypoxie und 20 min Reoxygenierung beobachtet. Eine Reoxygenierungsphase von 10 min ging mit ähnlicher Gefäßkontraktion einher, im Vergleich der drei verschiedenen Hypoxiezeiten. Im Vergleich zu der Reoxygenierungszeit von 10 min nahm die Vasokonstriktion afferenter Arteriolen auf Ang II bei 20 min Reoxygenierung im Vergleich von 30, 60 und 90 min Hypoxie zu ([P3] Fig. 4A; 4B).

Lebensfähigkeit von Nierenschnitten nach Hypoxie/Reoxygenierung- und Carbogenbehandlung

Mit Hilfe der H&E-Färbung konnte in den paraffinierten Nierenschnitten eine milde Zunahme nekrotischer Zellen nach 60 und 90 min H/R- und nach 90 min Carbogenbehandlung im Nierenmark und nach 30 und 60 min H/R in der Nierenrinde nachgewiesen werden ([P2] Fig. 2A; 2B; 2C; [P3] Fig. 1C). Mittels der TUNEL-Färbung konnte eine Zunahme apoptotischer Zellen in den lebenden Nierenschnitten gezeigt werden. Die Ergebnisse korrespondieren mit denjenigen Befunden, die auf Basis der H&E-Färbung erstellt wurden ([P2] Fig. 2D; 2E). Mit der TUNEL-Färbung konnte eine Zunahme apoptotischer Zellen im Nierenmark nach 90-minütiger Carbogenbehandlung im Vergleich zu 60-minütiger Carbogen- oder Hypoxiebehandlung beobachtet werden. Zusätzlich war die Anzahl apoptotischer Zellen im Nierenmark nach 90-minütiger Hypoxiebehandlung höher, als nach einer 60-minütigen Carbogenbehandlung ([P2] Fig. 2D). In der Nierenrinde konnte ab einer Behandlung von 60 min mit hypoxischen Gas eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zu 60- und 90-minütiger Carbogenbehandlung nachgewiesen werden ([P2] Fig. 2E). Eine Coexpression von anti- α -smooth muscle actin mit der TUNEL-Färbung wurde nicht beobachtet ([P2] Fig 3D).

Hypoxie/Reoxygenierung führt zu differenzierter Expression von radikalbildenden Enzymen

Es wurde die Expression der NADPH-Oxidaseenzyme NOX1, NOX2 und NOX4 in isolierten renalen Gefäßen des Nierenmarks und der Nierenrinde nach H/R im Vergleich zur Carbogenbehandlung bestimmt. In den descendierenden Vasa recta der Ratte konnten keine Expressionsveränderungen gemessen werden ([P2] Fig. 5). Im Vergleich dazu zeigte sich in den afferenten Arteriolen der Maus nach H/R eine signifikante Hochregulation der NOX2 und eine signifikante Runterregulation der NOX4 im Vergleich zur Kontrolle ([P3] Fig. 6B). Eine

Messung der Superoxiddismutase-Aktivität in lebenden Nierenschnitten der Maus zeigte eine signifikante Aktivitätsabnahme nach 90 min Hypoxie und 20 min Reoxygenierung im Vergleich zur Kontrolle ([P3] Fig. 7).

Zusätzlich wurde im Nierenmark die mRNA-Expression der drei NOS-Enzyme eNOS, nNOS und iNOS ermittelt. Alle drei Isoformen wurden in den isolierten descendierenden Vasa recta nach H/R signifikant herunter reguliert ([P2] Fig. 5). Die Bestimmung der mRNA Expression der Ang II-Rezeptoruntereinheiten in den isolierten afferenten Arteriolen zeigte keine Veränderung nach einer Hypoxie von 60 min ([P3] Fig. 6A).

Diskussion

Der Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Vasodilatation renaler interlobarier Gefäße der Ratte

Mit der Arbeit [P1] konnte gezeigt werden, dass Hypoxie und anschließende Reoxygenierung zu einer verminderten Vasodilatation der ILA der Ratte führen. Diese verminderte Vasodilatation ist endothelunabhängig und vermutlich auf einer Beeinträchtigung der Funktion der sGC in der glatten Gefäßmuskulatur zurückzuführen.

Die renalen Gefäße sind Effektoren des sympathischen und des Renin-Angiotensin-Systems sowie Zielorgan anderer lokaler vasoaktiver Systeme. Diese dadurch vermittelte Vasokonstriktion spielt bei der Pathogenese des IRI eine herausragende Rolle. Renale Gefäße können aber auch durch Ischämie und Reperfusion in ihrer Funktion gestört werden. Der Gefäßtonus ist von dem Verhältnis der Vasokonstriktoren zu -dilatoren abhängig. Dabei spielen auch die vom Gefäß selbst in großer Menge produzierten vasoaktiven Substanzen eine Rolle. In isolierten renalen Arterien verstärkt H/R die Reaktivität zu Ang II.²⁴ Dieser H/R-Effekt kann durch eine gesteigerte Vasoreaktivität nach H/R, Verschlechterung der Vasodilatation oder der Kombination aus beidem entstehen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hemmung verschiedener endothelialer vasodilatatorischer Systeme den H/R-Effekt einer verminderten Vasodilatation auf ACh nicht aufheben kann. Eine Blockade der NO-Synthese führte sogar zu einer verhältnismäßig geringeren Vasodilatation in der H/R-Gruppe, was auf eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit in den H/R-behandelten Gefäßen schließen lässt. Eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit nach H/R wurde auch in anderen Studien beschrieben.^{36,37} Es wurde auch gezeigt, dass die COX-produzierten Dilatoren nicht an der verminderten Vasodilatation nach H/R beteiligt sind. Dieses System spielt im Rahmen der endothelial-vermittelten Vasodilatation eine untergeordnete Rolle, wie Beobachtungen an isolierten renalen Arterien der Ratte und perfundierten afferenten Arteriolen zeigen.^{38,39} Allerdings waren *in vivo* Versuche an Ratten erfolgreicher, in denen auf eine Beteiligung der COX zu 20 bis 40% an der renalen Perfusion geschlossen wurde.⁴⁰ Möglicherweise sind Faktoren dafür notwendig, die sich in isolierten Gefäßen nicht mehr finden. EDHFs wurden als weitere wichtige Komponenten endothelialer Vasodilatation von Gefäßen beschrieben. Zwei wichtige Calcium-aktivierte Kaliumkanäle ($K_{Ca3.1}$, $K_{Ca2.1}$) wurden in der vorliegenden Arbeit nach H/R untersucht, allerdings konnte deren Inhibition die

verminderte Vasodilatation ebenfalls nicht aufheben und somit eine Beteiligung von EDHFs weitestgehend ausgeschlossen werden.

Eine Verschlechterung der Vasodilatation der ILA nach H/R wurde nur in Gefäßen beobachtet, die während der hypoxischen Phase mit einer nicht-konstriktorischen NA-Dosis behandelt wurden. Auch in anderen Versuchen an ILA der Maus war der H/R-Effekt auf die Ang II-induzierte Vasokonstriktion von der NA-Behandlung abhängig.²⁴ Der Einfluss einer adrenergen Stimulation unter physiologischen Bedingungen und bei Hypoxie auf die Ang II-Antwort wurde bisher wenig untersucht. Langzeitbehandlung mit NA beeinträchtigte die Vasodilatation von Arteriolen der Ratte in Abwesenheit von NA. Dies wurde auf mechanoadaptive Mechanismen der glatten Gefäßmuskelzellen zurückgeführt.⁴¹ Veränderungen in der Struktur glatter Gefäßmuskelzellen der ILA nach H/R treten vermutlich in unserem Modell nicht auf, wie die Untersuchung der Gefäßsteifheit zeigte. Im Zusammenhang mit dem IRI wird sehr häufig von der Entstehung von oxidativen Stress berichtet.⁴² Messungen der DHE-Fluoreszenz und der Messung der NADPH-Oxidase-mRNA-Expression sprechen allerdings gegen oxidativen Stress in unserem Modell. Auch die Ergebnisse der Tempol-Behandlung unterstützen die Annahme oxidativen Stresses nicht. Allerdings wurden mit den Untersuchungen vorrangig Superoxide getestet, und deshalb sind andere reaktive Sauerstoffspezien in diesem Zusammenhang nicht auszuschließen. Letztlich weisen die Ergebnisse auf eine untergeordnete Rolle des Endothels und von reaktiven Sauerstoffspezien im pathogenetischen Geschehen im verwendeten H/R-Modell hin. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus des H/R-Effektes wurde eine endothelunabhängige Stimulation der Gefäßdilataion mit dem NO-Donor SNP vorgenommen. Die Vasodilatation nach H/R war vermindert. Das Schlüsselenzym für die NO-induzierte Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur ist die sGC, welche die Bildung von cGMP katalysiert.²⁵ Der Abbau des cGMP wird durch PDE5 befördert. In der vorliegenden Arbeit sahen wir eine verminderte Vasodilatation der ILA bei Inhibition der PDE5 nach H/R. Dieses Ergebnis deutet auf eine niedrige cGMP-Produktion durch die sGC, eine verringerte PDE5-Aktivität oder Veränderungen in nachgeschalteten Signalwegen hin. 8-Br-cGMP, ein stabiles cGMP-Derivat, relaxierte ILA erst bei sehr hohen Konzentrationen, die keine Interpretation dieser Ergebnisse erlauben. Eine Inhibition der PKG, einem Enzym der cGMP-nachgeschalteten Signalwege, konnte die verminderte Vasodilatation nicht aufheben. Die cGMP-Konzentration war in den ILA nach H/R signifikant niedriger als bei den Kontrollen. Dies ließ vermuten, dass H/R zu einer Funktionseinschränkung der sGC führt. Die Vermutung wurde durch Experimente mit funktioneller Blockade der sGC bestätigt. Ein solcher Funktionsverlust kann

ein wichtiger pathologischer Faktor für die verminderte renale Perfusion nach einer Ischämie sein und zum IRI beitragen.

Der Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Funktion der Gefäße im Nierenmark und der Nierenrinde

In den Arbeiten [P2] und [P3] wurde gezeigt, dass H/R die Ang II-Antwort von descendierenden Vasa recta und afferenten Arteriolen lebender Nierenschnitte steigert. In afferenten Arteriolen beeinflusst die Dauer der Reoxygenierung die Stärke der Vasokonstriktion.

Die descendierenden Vasa recta kontrahierten nach 90 min Hypoxie und 10 min Reoxygenierung stärker auf Ang II als die entsprechenden Kontrollen. Die afferenten Arteriolen in den Nierenschnitten zeigten eine verstärkte Antwort auf Ang II, wobei bei einer Reoxygenierungsphase von 20 min die Stärke mit zunehmender Hypoxiezeit anstieg. Die afferenten Arteriolen des *in situ* Modells antworteten auf Ang II, NA, ET-1 und ATP mit einer Vasokonstriktion, was auch schon in anderen Studien an isolierten Gefäßen und juxtamedullären Nephronen gezeigt werden konnte.⁴³⁻⁴⁶ Das *in situ* Modell hat den Vorteil, dass die Arteriolen noch von den Nierentubuli umgeben sind und somit der Einfluss des umgebenden Gewebes auf die Gefäßfunktion beobachtet werden kann. Die Nierentubuli sind verantwortlich für die Freisetzung vasoaktiver Substanzen, was die Funktion des Nierenmarks und der Nierenrinde beeinflusst. Während einer hypoxischen Schädigung der Niere verändert sich die metabolische Zusammensetzung, als auch die Sekretion vasoaktiver Substanzen. Dies sollte die mikrovaskuläre Funktion beeinflussen. Ang II und das NO beeinflussen entscheidend den Gefäßtonus in der Niere.⁴⁷⁻⁴⁹ Sie sind möglicherweise auch bei IRI entscheidende Komponenten der Pathogenese. Folglich verbessert Ang II-Rezeptor-Hemmung die renale Funktion nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden. Nach Ischämie und Reoxygenierung ist auch oxidativer Stress zu erwarten. Der Radikalüberschuss kann die Bioverfügbarkeit von NO vermindern und somit eine verstärkte Vasokonstriktion renaler Gefäße bewirken.^{29,47,49} Dies würde auch die verzögerte Wiederherstellung eines normalen Vasotonus nach Hypoxie in der Reoxygenierungsphase bei Ischämie- und Reperfusionssphase erklären. Eine lokale Aktivierung von Ang II während eines Ischämie-Reperfusionsschadens führte in anderen Studien zur Aktivierung der NADPH-Oxidase, welche eine Hauptquelle der ROS ist.^{47,50} In den descendierenden Vasa recta war die NADPH-Oxidase-mRNA-Expression

nicht signifikant verändert. ROS-Konzentrationen oder Enzymaktivitäten wurden nicht gemessen. Die *in vitro* Situation der Messung spiegelt möglicherweise die mehr komplexe Situation *in vivo* nicht wider. Es kann deshalb oxidativer Stress in der *in vivo* Situation nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu den isolierten descendierenden Vasa recta war in den isolierten afferenten Arteriolen die NOX2-mRNA-Expression nach H/R erhöht und die NOX4-mRNA-Expression erniedrigt. Dieses Ergebnis spricht für eine veränderte ROS-Produktion in afferenten Arteriolen nach Hypoxie. Es ist bekannt, dass NOX4 vasoprotektiv wirkt,⁵¹ während sowohl NOX1-, als auch NOX2-Aktivierung eine endotheliale Fehlfunktion unterstützen können.⁵²⁻⁵⁴ Nach H/R war die Aktivität der SOD afferenter Arteriolen reduziert. Dies unterstützt die Annahme erhöhter Superoxidkonzentration und kann für die gesteigerte Ang II-induzierte Antwort verantwortlich sein.

Es wurde auch geprüft, ob H/R die Expression von NO-Synthasen beeinflusst. In den isolierten descendierenden Vasa recta zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der NOS-Isoformen, wie sie auch von anderen Studien bekannt ist.⁵⁵ Die Aktivität von nNOS wird als ein direkter Sauerstoffindikator genutzt, wobei eine reduzierte Aktivität einen reduzierten Sauerstoffgehalt widerspiegelt.⁵⁵ Die verminderte NOS-mRNA-Expression kann die Ursache einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und damit einer verstärkten Vasokonstriktion nach 90 Minuten Hypoxie in descendierenden Vasa recta sein.

Veränderte Rezeptorexpression oder Signalwege kommen auch als Ursache für die erhöhte Kontraktilität auf Ang II in Frage. In den afferenten Arteriolen war die Expression der Ang II-Rezeptoren nach H/R nicht verändert. Andere Studien sahen jedoch eine Herunterregulation der AT₁R-mRNA-Expression nach Ischämie/Reperfusion.⁴⁴

Die Befunde zur Vasoreaktivität in descendierenden Vasa recta und afferenten Arteriolen weisen auf eine wichtige pathogenetische Rolle beim IRI und bei der Entstehung eines AKI hin. Der Mechanismus ist möglicherweise vom Einfluss des umgebenden Nierengewebes unabhängig.

Methode des Nierenschnittes

Um die Überlebensfähigkeit der Nierenschnitte für das *in situ* Modell zu bestimmen, wurden H&E- und TUNEL-Färbungen durchgeführt. In den Nierenschnitten konnte das Auftreten einer Nekrose und Apoptose detektiert werden. Im Nierenmark wurde nach einer Carbogenbehandlung von 90 min ein signifikant höherer Anteil apoptotischer Zellen gesehen, im Vergleich zu einer Hypoxiebehandlung von 60 min. Der hohe Anteil apoptotischer Zellen im Nierenmark könnte nach der Carbogenbehandlung für die beobachtete Abschwächung der

kontraktilen Funktion der descendierenden Vasa recta verantwortlich sein. In der Nierenrinde wurde mit der Länge der Hypoxie eine signifikante Zunahme der Gewebeschädigung ermittelt. Die Schäden waren auch größer im Vergleich zur 60 und 90 min Carbogenbehandlung. Aufgrund der Ergebnisse wurde geschlossen, dass das Überleben der Nierenschnitte auf 90 min begrenzt ist. Bei den Untersuchungen des Nierenmarkgewebes konnte keine Coexpression von α -smooth-muscle-actin in den Perizyten der descendierenden Vasa recta und TUNEL festgestellt werden. Der Fund weist auf wenig Zellapoptose in den descendierenden Vasa recta und damit höhere Resistenz gegenüber Hypoxie im Vergleich zu den tubulären Zellen hin.

Schlussfolgerung

Die verminderte vasodilatatorische Antwort großer renaler Leitungsgefäße und die verstärkte vasokonstriktorische Antwort renaler Mikrogefäße nach H/R, tragen zu erhöhtem renalem vaskulärem Widerstand und zur Pathogenese des IRI bei. Beide Befunde unterstützen die Annahme einer kritischen Rolle des Gefäß- bzw. Mikrogefäßsystems bei der verzögerten Wiederherstellung der renalen Perfusion nach einer Ischämie. Wir zeigen hier, dass insbesondere die glatte Gefäßmuskulatur nach Hypoxie funktionell verändert ist. Die hier herausgearbeitete Rolle der sGC in der Genese verminderter Vasodilatation eröffnet Ansätze für Prävention und Therapie von IRI und AKI.

Literaturverzeichnis

- 1 Sutherland SM, Byrnes JJ, Kothari M, Longhurst CA, Dutta S, Garcia P, Goldstein SL. AKI in hospitalized children: comparing the pRIFLE, AKIN, and KDIGO definitions. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**, 554-561, doi:10.2215/cjn.01900214 (2015).
- 2 Hoste EA, Kellum JA. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr Opin Crit Care* **12**, 531-537, doi:10.1097/MCC.0b013e3280102af7 (2006).
- 3 Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med* **36**, S146-151, doi:10.1097/CCM.0b013e318168c590 (2008).
- 4 Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **39**, 930-936, doi:10.1053/ajkd.2002.32766 (2002).
- 5 Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**, R204-212, doi:10.1186/cc2872 (2004).
- 6 Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *Jama* **294**, 813-818, doi:10.1001/jama.294.7.813 (2005).
- 7 Wong GT, Irwin MG. Contrast-induced nephropathy. *British journal of anaesthesia* **99**, 474-483, doi:10.1093/bja/aem237 (2007).
- 8 Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med* **14**, 502-516, doi:10.2119/2008-00006.Legrand (2008).
- 9 Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **25**, 635-643 (1971).
- 10 Cantow K, Flemming B, Ladwig-Wiegand M, Persson PB, Seeliger E. Low dose nitrite improves reoxygenation following renal ischemia in rats. *Scientific reports* **7**, 14597, doi:10.1038/s41598-017-15058-5 (2017).
- 11 Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW. Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circulation research* **37**, 558-568 (1975).
- 12 Yamamoto T, Tada T, Brodsky SV, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F, Goligorsky MS. Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F1150-1155, doi:10.1152/ajprenal.00310.2001 (2002).
- 13 Schmitz V, Schaser KD, Olschewski P, Neuhaus P, Puhl G. In vivo visualization of early microcirculatory changes following ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* **40**, 19-25, doi:10.1159/000107683 (2008).
- 14 Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res* **77**, 4-7, doi:10.1016/j.mvr.2008.09.004 (2009).
- 15 Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F191-198, doi:10.1152/ajprenal.00042.2003 (2003).
- 16 Evans RG, Gardiner BS, Smith DW, O'Connor PM. Intrarenal oxygenation: unique challenges and the biophysical basis of homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1259-1270, doi:10.1152/ajprenal.90230.2008 (2008).

- 17 Johannes T, Mik EG, Ince C. Dual-wavelength phosphorimetry for determination of cortical and subcortical microvascular oxygenation in rat kidney. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) **100**, 1301-1310, doi:10.1152/jappphysiol.01315.2005 (2006).
- 18 Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Myers BD. Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *The Journal of clinical investigation* **101**, 2054-2064, doi:10.1172/jci772 (1998).
- 19 Rabb H, Michishita M, Sharma CP, Brown D, Arnaout MA. Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *The American journal of physiology* **267**, F1052-1058, doi:10.1152/ajprenal.1994.267.6.F1052 (1994).
- 20 Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F, Goligorsky MS. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F1140-1149, doi:10.1152/ajprenal.00329.2001 (2002).
- 21 Bonventre JV. Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 2199-2210, doi:10.1097/01.asn.0000079785.13922.f6 (2003).
- 22 Patzak A, Lai E, Persson PB, Persson AE. Angiotensin II-nitric oxide interaction in glomerular arterioles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**, 410-414, doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04203.x (2005).
- 23 Patzak A, Persson AE. Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension* **16**, 46-51, doi:10.1097/MNH.0b013e328011a89b (2007).
- 24 Kaufmann J, Martinka P, Moede O, Sendeski M, Steege A, Föhling M, Hultström M, Gaestel M, Moraes-Silva IC, Nikitina T, Liu ZZ, Zavaritskaya O, Patzak A. Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries. *Acta Physiol (Oxf)* **213**, 920-932, doi:10.1111/apha.12457 (2015).
- 25 Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *The American journal of physiology* **272**, F561-578, doi:10.1152/ajprenal.1997.272.5.F561 (1997).
- 26 Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *The Journal of clinical investigation* **94**, 1069-1075, doi:10.1172/jci117421 (1994).
- 27 Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 214-220, doi:10.1038/nrm762 (2002).
- 28 Legrand M, Almac E, Mik EG, Johannes T, Kandil A, Bezemer R, Payen D, Ince C. L-NIL prevents renal microvascular hypoxia and increase of renal oxygen consumption after ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F1109-1117, doi:10.1152/ajprenal.90371.2008 (2009).
- 29 Aksu U, Demirci C, Ince C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide. *Contributions to nephrology* **174**, 119-128, doi:10.1159/000329249 (2011).
- 30 Silldorff EP, Hilbun LR, Pallone TL. Angiotensin II constriction of rat vasa recta is partially thromboxane dependent. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **40**, 541-546 (2002).
- 31 Silldorff EP, Kreisberg MS, Pallone TL. Adenosine modulates vasomotor tone in outer medullary descending vasa recta of the rat. *The Journal of clinical investigation* **98**, 18-23, doi:10.1172/jci118764 (1996).

- 32 Fellner SK, Arendshorst WJ. Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F1012-1019, doi:10.1152/ajprenal.00144.2005 (2005).
- 33 Cao C, Edwards A, Sendeski M, Lee-Kwon W, Cui L, Cai CY, Patzak A, Pallone TL. Intrinsic nitric oxide and superoxide production regulates descending vasa recta contraction. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F1056-1064, doi:10.1152/ajprenal.00070.2010 (2010).
- 34 Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **284**, R1355-1369, doi:10.1152/ajpregu.00701.2002 (2003).
- 35 Liu ZZ, Schmerbach K, Lu Y, Perlewitz A, Nikitina T, Cantow K, Seeliger E, Persson PB, Patzak A, Liu R, Sendeski MM. Iodinated contrast media cause direct tubular cell damage, leading to oxidative stress, low nitric oxide, and impairment of tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol Renal Physiol* **306**, F864-872, doi:10.1152/ajprenal.00302.2013 (2014).
- 36 Feelisch M, Fernandez BO, Bryan NS, Garcia-Saura MF, Bauer S, Whitlock DR, Ford PC, Janero DR, Rodriguez J, Ashrafi H. Tissue processing of nitrite in hypoxia: an intricate interplay of nitric oxide-generating and -scavenging systems. *The Journal of biological chemistry* **283**, 33927-33934, doi:10.1074/jbc.M806654200 (2008).
- 37 Liu M, Zollbrecht C, Peleli M, Lundberg JO, Weitzberg E, Carlström M. Nitrite-mediated renal vasodilatation is increased during ischemic conditions via cGMP-independent signaling. *Free radical biology & medicine* **84**, 154-160, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.025 (2015).
- 38 Grbovic L, Djokic J, Radenkovic M, Pesic S. Analysis of the vasorelaxant action of angiotensin II in the isolated rat renal artery. *Journal of pharmacological sciences* **106**, 376-384 (2008).
- 39 Wang D, Borrego-Conde LJ, Falck JR, Sharma KK, Wilcox CS, Umans JG. Contributions of nitric oxide, EDHF, and EETs to endothelium-dependent relaxation in renal afferent arterioles. *Kidney Int* **63**, 2187-2193, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00036.x (2003).
- 40 Dautzenberg M, Just A. Temporal characteristics of nitric oxide-, prostaglandin-, and EDHF-mediated components of endothelium-dependent vasodilation in the kidney. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **305**, R987-998, doi:10.1152/ajpregu.00526.2012 (2013).
- 41 Martinez-Lemus LA, Hill MA, Bolz SS, Pohl U, Meininger GA. Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 708-710, doi:10.1096/fj.03-0634fje (2004).
- 42 Jankauskas SS, Andrianova NV, Alieva IB, Prusov AN, Matsievsky DD, Zorova LD, Pevzner IB, Savchenko ES, Pirogov YA, Silachev DN, Plotnikov EY, Zorov DB. Dysfunction of Kidney Endothelium after Ischemia/Reperfusion and Its Prevention by Mitochondria-Targeted Antioxidant. *Biochemistry. Biokhimiia* **81**, 1538-1548, doi:10.1134/s0006297916120154 (2016).
- 43 Boke T, Malik KU. Enhancement by locally generated angiotensin II of release of the adrenergic transmitter in the isolated rat kidney. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **226**, 900-907 (1983).
- 44 Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *The American journal of physiology* **274**, F79-90 (1998).

- 45 Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T. Differential regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **40**, 34-40 (2002).
- 46 Vuurmans JL, Boer P, Koomans HA. Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 2742-2746, doi:10.1093/ndt/gfh471 (2004).
- 47 Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox biology* **6**, 524-551, doi:10.1016/j.redox.2015.08.020 (2015).
- 48 Persson AE, Lai EY, Gao X, Carlstrom M, Patzak A. Interactions between adenosine, angiotensin II and nitric oxide on the afferent arteriole influence sensitivity of the tubuloglomerular feedback. *Frontiers in physiology* **4**, 187, doi:10.3389/fphys.2013.00187 (2013).
- 49 Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxidants & redox signaling* **25**, 119-146, doi:10.1089/ars.2016.6665 (2016).
- 50 Araujo M, Wilcox CS. Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & redox signaling* **20**, 74-101, doi:10.1089/ars.2013.5259 (2014).
- 51 Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**, 452-463, doi:10.1016/j.tem.2014.06.012 (2014).
- 52 Carlström M, Lai EY, Ma Z, Patzak A, Brown RD, Persson AE. Role of NOX2 in the regulation of afferent arteriole responsiveness. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **296**, R72-79, doi:10.1152/ajpregu.90718.2008 (2009).
- 53 Nazarewicz RR, Dikalova AE, Bikineyeva A, Dikalov SI. Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **305**, H1131-1140, doi:10.1152/ajpheart.00063.2013 (2013).
- 54 Zheleznova NN, Yang C, Cowley AW Jr. Role of Nox4 and p67phox subunit of Nox2 in ROS production in response to increased tubular flow in the mTAL of Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F450-458, doi:10.1152/ajprenal.00187.2016 (2016).
- 55 Semenza GL. New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2976-2978, doi:10.1172/jci26792 (2005).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Diana Braun, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Hypoxie und Nierengefäßfunktion" 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 den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, 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

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Diana Braun hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Diana Braun, Christa Zollbrecht, Stefanie Dietze, Rudolf Schubert, Stefan Golz, Holger Summer, Pontus B. Persson, Mattias Carlström, Marion Ludwig, Andreas Patzak
Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling.
Frontiers in Physiology, 2018 May

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und Durchführung der funktionellen Untersuchungen an interlobaren Arterien der Ratte (>300 Experimente)
- Isolation von Gefäßen und Experimente für molekularbiologische Untersuchungen (qPCR, ELISA)
- Isolation von Gefäßen und Experimente für Fluoreszenzuntersuchungen
- Auswertung der funktionellen und anderen Experimente
- Statistische Analyse aller Daten
- Anfertigung des Manuskriptes und Revisionen

Publikation 2:

Diana Braun, Stefanie Dietze, Tamara M.J. Pahlitzsch, Ingrid C. Wennysia, Pontus B. Persson, Marion Ludwig, Andreas Patzak

Short-term hypoxia and vasa recta function in kidney slices

Clinical Hemorheology and Microcirculation 67, 2017 September

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und Durchführung der Experimente an lebenden Nierenschnitten der Ratte
- Histologische Arbeiten für TUNEL- und Nekrose-Bewertung
- Aufarbeitung der Nierengefäße für qPCR
- Datenanalyse und Statistik
- Anfertigung des Manuskriptes und Revisionen

Publikation 3:

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

Hypoxia-reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II

American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2018 March

Beitrag im Einzelnen:

- Diskussion der Daten
- Beitrag bei der Abfassung des Manuskriptes (Methoden und Ergebnisse)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Ausgewählte Publikationen

Publikation 1

Diana Braun, Christa Zollbrecht, Stefanie Dietze, Rudolf Schubert, Stefan Golz, Holger Summer, Pontus B. Persson, Mattias Carlström, Marion Ludwig, Andreas Patzak

Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling.

Front Physiol. 2018 May 3;9:480. doi: 10.3389/fphys.2018.00480.

Impact Factor: 4.134



Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling

Diana Braun^{1,2}, Christa Zollbrecht³, Stefanie Dietze^{1,2}, Rudolf Schubert⁴, Stefan Golz⁵, Holger Summer⁵, Pontus B. Persson^{1,2}, Mattias Carlström³, Marion Ludwig^{1,2†} and Andreas Patzak^{1,2*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Christine Kranz,
Universität Ulm, Germany

Reviewed by:

Franziska Theilig,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Germany

Jennifer M. Sasser,
University of Mississippi Medical
Center, United States

*Correspondence:

Andreas Patzak
andreas.patzak@charite.de

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Renal and Epithelial Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 21 December 2017

Accepted: 16 April 2018

Published: 03 May 2018

Citation:

Braun D, Zollbrecht C, Dietze S,
Schubert R, Golz S, Summer H,
Persson PB, Carlström M, Ludwig M
and Patzak A (2018)
Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal
Arteries Impairs Vasorelaxation via
Modulation
of Endothelium-Independent
sGC/cGMP/PKG Signaling.
Front. Physiol. 9:480.
doi: 10.3389/fphys.2018.00480

¹ Renal Vessel Physiology Group, Institute of Vegetative Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany,

² Institute of Vegetative Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, ³ Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, ⁴ Centre for Biomedicine and Medical Technology Mannheim, Research Division Cardiovascular Physiology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany,

⁵ Bayer Pharma AG, Wuppertal, Germany

Ischemia/reperfusion injury holds a key position in many pathological conditions such as acute kidney injury and in the transition to chronic stages of renal damage. We hypothesized that besides a reported disproportional activation of vasoconstrictor response, hypoxia/reoxygenation (H/R) adversely affects endothelial dilatory systems and impairs relaxation in renal arteries. Rat renal interlobar arteries were studied under isometric conditions. Hypoxia was induced by application of 95% N₂, 5% CO₂ for 60 min to the bath solution, followed by a 10 min period of reoxygenation (95% O₂, 5% CO₂). The effect of H/R on relaxation was assessed using various inhibitors of endothelial dilatory systems. mRNA expression of phosphodiesterase 5 (PDE5), NADPH oxidases (NOX), and nitric oxide synthase (NOS) isoforms were determined using qRT-PCR; cGMP was assayed with direct cGMP ELISA. Acetylcholine induced relaxation was impaired after H/R. Inhibition of the NOS isoforms with L-NAME, and cyclooxygenases (COXs) by indomethacin did not abolish the H/R effect. Moreover, blocking the calcium activated potassium channels K_{Ca3.1} and K_{Ca2.1}, the main mediators of the endothelium-derived hyperpolarizing factor, with TRAM34 and UCL1684, respectively, showed similar effects in H/R and control. Arterial stiffness did not differ comparing H/R with controls, indicating no impact of H/R on passive vessel properties. Moreover, superoxide was not responsible for the observed H/R effect. Remarkably, H/R attenuated the endothelium-independent relaxation by sodium nitroprusside, suggesting endothelium-independent mechanisms of H/R action. Investigating the signaling downstream of NO revealed significantly decreased cGMP and impaired relaxation during PDE5 inhibition with sildenafil after H/R. Inhibition of PKG, the target of cGMP, did not normalize SNP-induced relaxation following H/R. However, the soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor ODQ abolished the H/R effect on relaxation.

The mRNA expressions of the endothelial and the inducible NOS were reduced. NOX and PDE5 mRNA were similarly expressed in H/R and control. Our results provide new evidence that impaired renal artery relaxation after H/R is due to a dysregulation of sGC leading to decreased cGMP levels. The presented mechanism might contribute to an insufficient renal reperfusion after ischemia and should be considered in its pathophysiology.

Keywords: hypoxia, ischemia/reperfusion injury, nitric oxide, cGMP, sGC, vascular smooth muscle, relaxation

INTRODUCTION

Its function and anatomical structure render the kidney very susceptible to ischemia/reperfusion injury (IRI). IRI has been reported in renal transplantation and, amongst others, in the development of acute kidney injury (AKI), diabetic nephropathy and contrast agent-induced nephropathy (Reuter and Mrowka, 2015; Maringer and Sims-Lucas, 2016). IRI may result from insufficient renal perfusion of different origin, followed by the re-establishment of blood flow (Le Dorze et al., 2009). In contrast to many other organs, where ischemia is followed by an exaggerated flow in the reperfusion period, renal blood flow re-establishes slowly over a period of many minutes (Schneider et al., 2010; Cantow et al., 2017). Moreover, no-reflow phenomenon has been described in IRI experiments (Patschan et al., 2012). This delayed restoration of renal blood flow after ischemia may reflect kidney specific blood vessel properties and/or interactions of renal vasculature with the surrounding tubules. In addition, renal vasculature may be affected by the activation of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system (RAS) resulting in an increased vascular resistance in IRI (Kontogiannis and Burns, 1998; Mutoh et al., 2014). Experiments in isolated renal arteries of mice revealed increased reactivity to angiotensin II (Ang II) after hypoxia/reoxygenation (H/R) in the presence of norepinephrine (NE) in physiological concentrations, supporting the idea of a concerted action of both systems on renal vascular tone. H/R may modify vessel function by several mechanisms. Besides the proposed disproportional activation of vasoconstrictor systems and a potential increase in oxidative stress including enhanced superoxide levels, endothelial dilatory systems could be equally affected by H/R (Jancauskas et al., 2016; Pahlitzsch et al., 2018). However, no data exist regarding the direct influence of H/R on renal vessel relaxation. Endothelial-derived vasoactive substances, such as nitric oxide (NO), cyclooxygenase (COX)-synthesized prostaglandins or the endothelial-derived hyperpolarizing factor (EDHF) might be responsible for the vasodilatory response following H/R. The gasotransmitter NO is a potent vasodilator and exerts its vasodilatory effects via different pathways. Endogenously produced NO diffuses to vascular smooth muscle cells (VSMCs), where it initiates relaxation mainly via the soluble guanylyl cyclase/cyclic GMP/PKG (sGC/cGMP/PKG) pathway (Denninger and Marletta, 1999). H/R might compromise any step of this pathway leading to impaired relaxation. Interestingly, the effect of H/R on the balance of vasoconstriction and relaxation is sparsely investigated in the pathophysiology of

IRI. In the present study, we aimed at investigating the vascular effects of H/R in the presence of physiological NE concentrations in a rat model of renal arterial vessels [interlobar arteries (ILAs)] and studied endothelium-dependent and independent relaxation. Results indicate that H/R impairs relaxation via endothelium-independent mechanisms, adversely affecting sGC/cGMP signaling. We therefore propose that unbalanced vasodilator systems in contrast to enhanced vasoconstriction should be reassessed concerning the pathophysiology of IRI and considered in future studies of the renal vasculature.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Male Sprague-Dawley rats (purchased from Charles River, Sulzfeld, Germany) (270–400 g, 10 weeks of age, $n = 140$) were included in the study. The animals were given food and water *ad libitum*. They were housed in the animal house of the Charité – Universitätsmedizin Berlin at a controlled ambient temperature of 22°C with 50% ± 10% relative humidity and with a 12-h light/12-h dark cycle. Protocols and animal handling were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Experiments were approved by the Office for Health and Social Matters of Berlin (Berlin, Germany, T0061/08).

Chemicals

The following drugs were used: acetylcholine (ACh), phenylephrine (PE), sodium nitroprusside (SNP), NE, L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methylester hydrochloride), indomethacin, TRAM34 (1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole), UCL 1684 (6,12,19,20,25,26-hexahydro-5,27:13,18:21,24-trietheno-11,7-metheno-7H-dibenzo [b,n] [1,5,12,16] tetraazacyclotricosine-5,13-diium dibromide), sildenafil citrate, 4-hydroxy-TEMPO, 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cGMP) ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) and DT-2 trifluoroacetate salt (DT-2). All substances were obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) with the exception of indomethacin, ODQ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, United States) and sildenafil citrate (Biomol GmbH, Hamburg, Germany). Distilled water was used to prepare the chemical solutions, except for indomethacin, TRAM34, UCL 1684, ODQ and sildenafil citrate, which were dissolved in >99.7% dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration

of DMSO was below 0.1% in all of the experiments. SNP was dissolved in distilled water immediately before start of the experiment in lightproof tubes. Concentrations are given as final molar concentration in the bath solution.

Preparation of Rat Interlobar Arteries

The animals were killed by decapitation under isoflurane. The kidneys were removed immediately and placed in cold preparation solution (146 mmol/NaCl, 4.5 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5 mmol/l glucose, 0.025 mmol/l Na (EDTA), 5 mmol/l HEPES, and 0.1 mmol/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7.4). Kidneys were sliced along the main axis of tubular and vascular structures. ILA were dissected and arterial sections (length: 2 mm) were isolated.

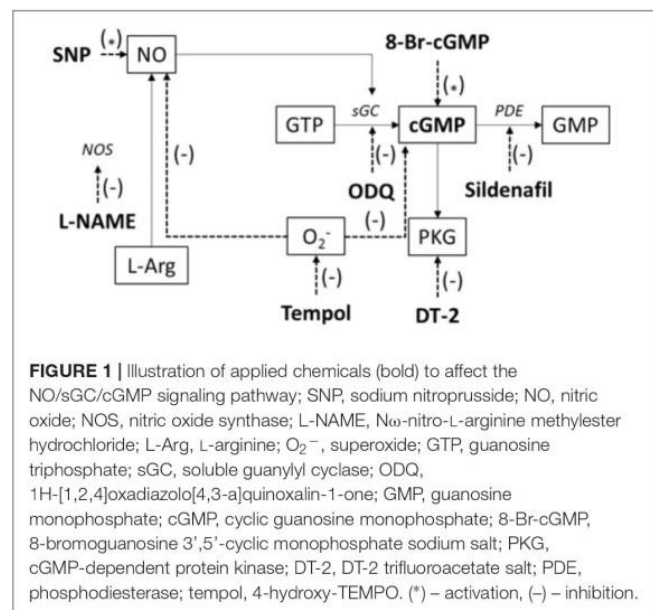
Measurements of Vascular Responses

Interlobar arteries were mounted on 40- μm stainless steel wires in a small vessel myograph (model 410A, DMT, Denmark) filled with cold preparation solution. After mounting, the solution was changed to experimental solution (119 mmol NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH_2PO_4 , 1.2 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.1 mmol/l glucose, 25 mmol/l NaHCO_3 , and 2.5 mmol/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7.4). The myograph was heated up to 37°C under unlimited gas flow of carbogen (95% O_2 , 5% CO_2). Thereafter, vessels underwent a normalization procedure to an internal circumference equivalent to 90% of that produced under an intramural pressure of 100 mmHg. The viability of ILA was demonstrated by application of K-PSS (123.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH_2PO_4 , 1.2 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.1 mmol/l glucose, 25 mmol/l NaHCO_3 and 2.5 mmol/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7.4). Endothelial function was tested by cumulative concentration–response relationships to ACh (10^{-9} to 10^{-5} mol/l) on arteries precontracted with PE to 50–70% of the maximum arterial force to K-PSS. Only arteries showing complete contraction to K-PSS and relaxation (>70%) to ACh were used for the subsequent experiments. In initial experiments, the effect of pO_2 on vasoreactivity was tested and ILA exposed to either ambient O_2 (21% O_2) or carbogen (95% O_2). For all following experiments, ILA were exposed to hypoxic gas (95% N_2 , 5% CO_2) or carbogen (control) for 60 min followed by 10 min of reoxygenation with carbogen. NE in a non-pressor concentration (10^{-9} mol/l) was applied during the hypoxic and the control situation to simulate a sympathetic activity. NE was washed out during the reoxygenation period. Data were digitized using PowerLab system (ADInstruments, Spechbach, Germany).

Measurements of Endothelial Dilatory Function

Figure 1 represents a scheme to illustrate the protocols used to investigate the endothelium-independent pathways and to affect the NO/sGC/cGMP signaling.

L-NAME [inhibitor of endothelial NO synthase (eNOS), inducible NOS (iNOS), and neuronal NOS (nNOS), 10^{-4} mol/l], or indomethacin (inhibitor of COXs, 10^{-5} mol/l), or TRAM34 ($\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ blocker, 10^{-6} mol/l), UCL 1684 ($\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ blocker, 10^{-7} mol/l) or ODQ (sGC inhibitor, 10^{-5} mol/l) were



applied during the entire 60 + 10 min period. Immediately after the reoxygenation period, ACh concentration–response relationships (10^{-9} to 10^{-5} mol/l) were obtained from PE precontracted ILA in the presence or absence of the mentioned drugs.

Measurements of Endothelium-Independent Relaxation

Sodium nitroprusside was used for endothelium-independent induction of relaxation. Concentration–response relationships to SNP (10^{-9} to 10^{-4} mol/l) were obtained from precontracted ILA (PE), while the endothelial dilatory systems via NOS and COX were inhibited by L-NAME (10^{-4} mol/l) and indomethacin (10^{-5} mol/l), respectively. To test the role of cGMP as an important mediator of NO induced relaxation, 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (10^{-8} to 3×10^{-4} mol/l), a stable form of cGMP, was added to precontracted ILA. The downstream target PKG was investigated by inhibition using DT-2 trifluoroacetate salt (10^{-7} mol/l). Further, a potential role of PDE5 for the H/R effect on relaxation was tested by applying sildenafil citrate (10^{-8} to 10^{-5} mol/l). To exclude an influence of oxidative stress, 4-hydroxy-TEMPO (tempol, 10^{-4} mol/l) was added during the 60 + 10 min H/R period.

Measurements of Vascular Wall Stiffness

Length-tension relationships were obtained by stretching the vessels in 20 μm steps until the wall tension was 4.5 mN/mm after the 60 + 10 min H/R period in order to investigate mechanical properties of the VSMCs in ILA. The experimental data of each vessel were fitted by using the equation $T = T_0 \exp [\beta \cdot (IC - IC_0)/IC_0]$. T is the wall tension (mN/mm), T_0 is the wall tension at the transmural pressure of 100 mmHg, IC_0 is the internal

circumference (mm) of the vessels at the transmural pressure of 100 mmHg and IC is the internal circumference (mm) of the vessels. The parameter beta expresses vascular wall stiffness (Freslon and Giudicelli, 1983; Nyborg et al., 1987).

Preparation of Rat Interlobar Arteries for Gene Expression Analysis

Isolated ILA were kept in experimental solution at 37°C in an oxygenation chamber and were exposed to hypoxic gas or carbogen for 60 min followed by 10 min of reoxygenation with carbogen. NE (10^{-9} mol/l) was applied during the hypoxic and control period and was washed out during reoxygenation.

RNA Isolation and Quantitative PCR

The mRNA was promptly isolated. The tissue was homogenized in lysis buffer (1.0% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mmol/l NaF, 80 mmol/l Tris, pH 7.5) containing enzyme inhibitors (Complete Mini; 1 tablet/1.5 ml; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). RNA was isolated with RNA-Bee-reagent (Biozol, Eching, Germany) and reverse transcribed with random hexamers (High Capacity cDNA RT-Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, United States, #4374966), according to the manufacturer's protocols. QPCR was performed using a Lightcycler LC480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's protocols and with a StepOnePlus device (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) using SYBR Green for fluorescent detection of DNA generated during PCR, respectively. The expression levels of mRNA were normalized to 18SrRNA and the housekeeping gene RPL32, respectively (primer sequences: see Table 1). Relative expressions to control situation were calculated by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -method.

Analysis of Reactive Oxygen Species Formation and Distribution

Interlobar arteries were mounted and exposed to hypoxia or carbogen for 60 min in the presence of NE (10^{-9} mol/l), followed by a reoxygenation step of 10 min. During the treatment ILA were incubated with dihydroethidium (DHE) (2×10^{-5} mol/l) for 30 min followed by wash-out. ILA were immediately frozen in tissue tek (Sakura, Staufen, Germany). Cryosections (10 μ m) were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride). DHE fluorescence was captured using a Zeiss Axiophot fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M, software Axiovision 3.0). For each vessel, DHE fluorescence was measured in four separate cryosections (four arterial rings) and calculated from 10 separate high power fields/image using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, United States).

Direct cGMP ELISA

Interlobar arteries were isolated (see gene expression analysis) and exposed to hypoxia or carbogen for 60 min in the presence of NE (10^{-9} mol/l), followed by a reoxygenation step of 10 min. ILA were frozen and stored at -80°C until assay. The cGMP levels in ILA were measured using a direct cGMP ELISA kit (Enzo Life

Sciences, Lausen, Switzerland) according to the manufacturer's instruction.

Statistical Analyses

EC₅₀ were calculated by fitting the concentration–response relationship using a non-linear four parameter logistic function. Differences in EC₅₀ were tested by a non-parametric Wilcoxon test for independent variables (Sigmaplot 13.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Germany). If applicable, differences during the concentration–response relationships were tested by ANOVA for repeated measurements and non-normal distribution (Brunner test, “R” project¹). ANOVA followed by Wilcoxon test and correction for multiple comparisons were used for testing group differences of expression. mRNA expression data were tested by the Mann–Whitney test. Data are presented as mean \pm SEM. The *n*-value given in the figures corresponds to vessel number. The confidence level *P* was set to 0.05.

RESULTS

Impaired Relaxation of Rat Interlobar Arteries After H/R

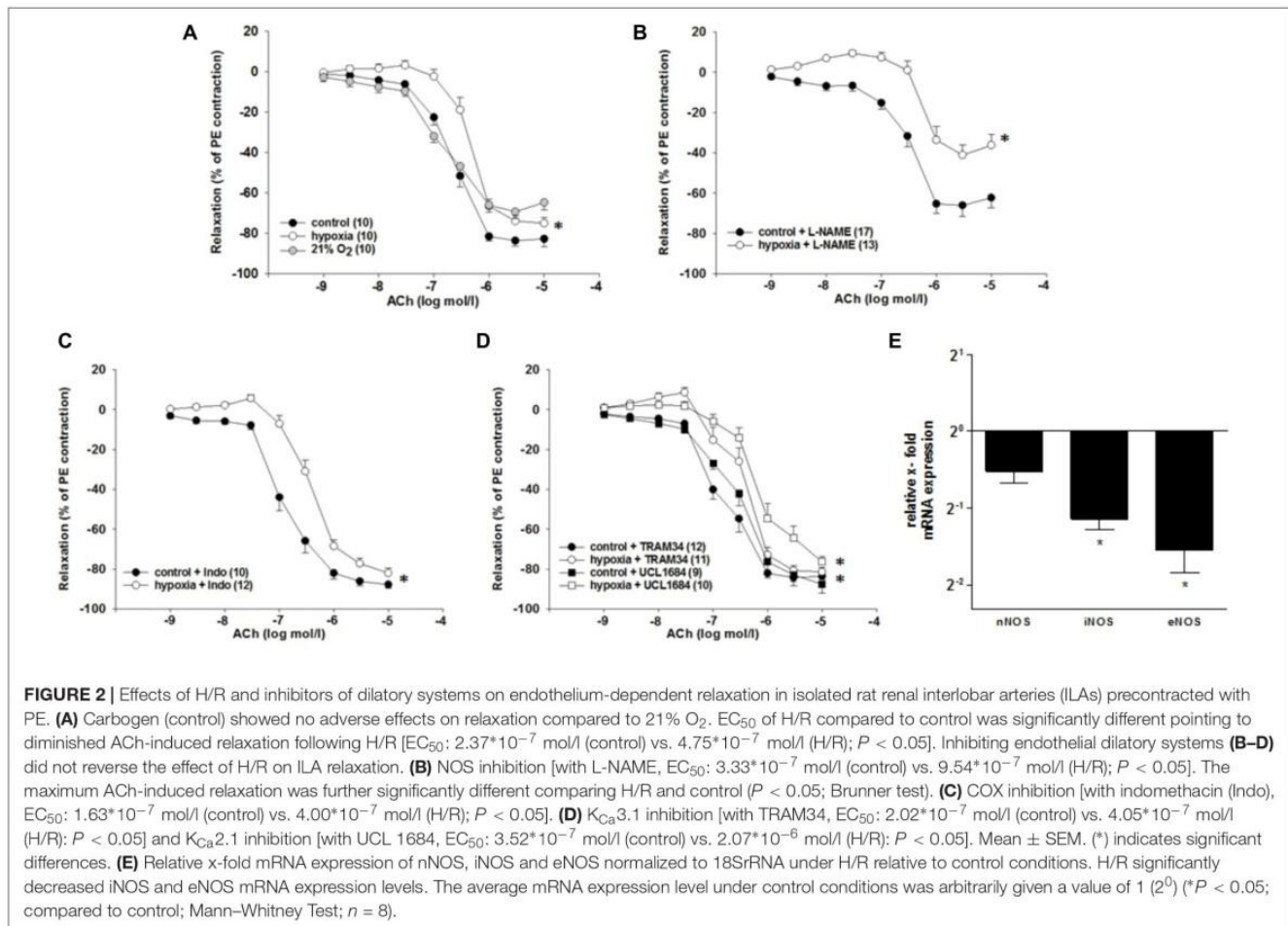
To simulate the effect of H/R in the kidney, hypoxia for 60 min and reoxygenation for 10 min were applied to isolated ILA from rats. Initial experiments excluded adverse effects of carbogen exposure compared to ambient pO₂ on vasoreactivity of ILA (EC₅₀: 3.3×10^{-8} mol/l (carbogen) vs. 1.7×10^{-8} mol/l (21% O₂), Figure 2A).

In order to approach the *in vivo* situation, a non-constrictor concentration of NE (10^{-9} mol/l) was applied during the hypoxic period and the respective control period. Hypoxia in presence of NE followed by reoxygenation decreased the sensitivity to ACh compared to control conditions [EC₅₀: 2.4×10^{-7} mol/l (control) vs. 4.8×10^{-7} mol/l (H/R); *P* = 0.004, Figure 2A]. Hypoxia without NE treatment did not affect the relaxation to ACh and NE did not affect the ACh-induced relaxation in the control group (data not shown).

¹<https://www.r-project.org/>

TABLE 1 | Primer for the mRNA expression studies.

Primer	Forward	Reverse
nNOS	ATCCAGGTGGACAGAGA CCTCGATG	CCGAGGTAGGGGACTGT TCCTTCTCT
iNOS	CAGGTGCTATCCCAGCC CAACA	CATTCTGTGCAGTCCCAGTG AGGAA
eNOS	CAGCACCAGACCACAGCCCC	TCCTGTGTGAGCCTGTGCACT
NOX1	CGTCACTCCCTTTGCTTCCT	AGGCACCCGTCTCTCTACAA
NOX2	CTGCCAGTGTGTCCGAATCT	ACACACCACATCCACGTTGAA
NOX4	TTGGTGAACGCCCTGAACCT	TACCACCACCATCGAGACAC
18S rRNA	ACGGACCAGAGCCGAAAGCAT	TGTCAATCCTGTCCGTGTCC
PDE5A	GTCTGCCCAAACCCCTAAAA	CGCTGTTCCAGATCAGACA
RPL32	GAAAGAGCAGCACAGCTGGC	TCATTCTTTCGCTGCGTAGC



Endothelial-Dependent Dilatory Systems Are Not Responsible for the H/R Effect

To investigate the mechanisms behind the observed diminished vasodilatory response to H/R (hereafter: “H/R effect”), inhibitors of main endothelium-dependent dilatory systems were applied during the experiment. If any of the investigated systems is responsible for the H/R effect, the respective inhibition should align the concentration–response-relationship of control and H/R.

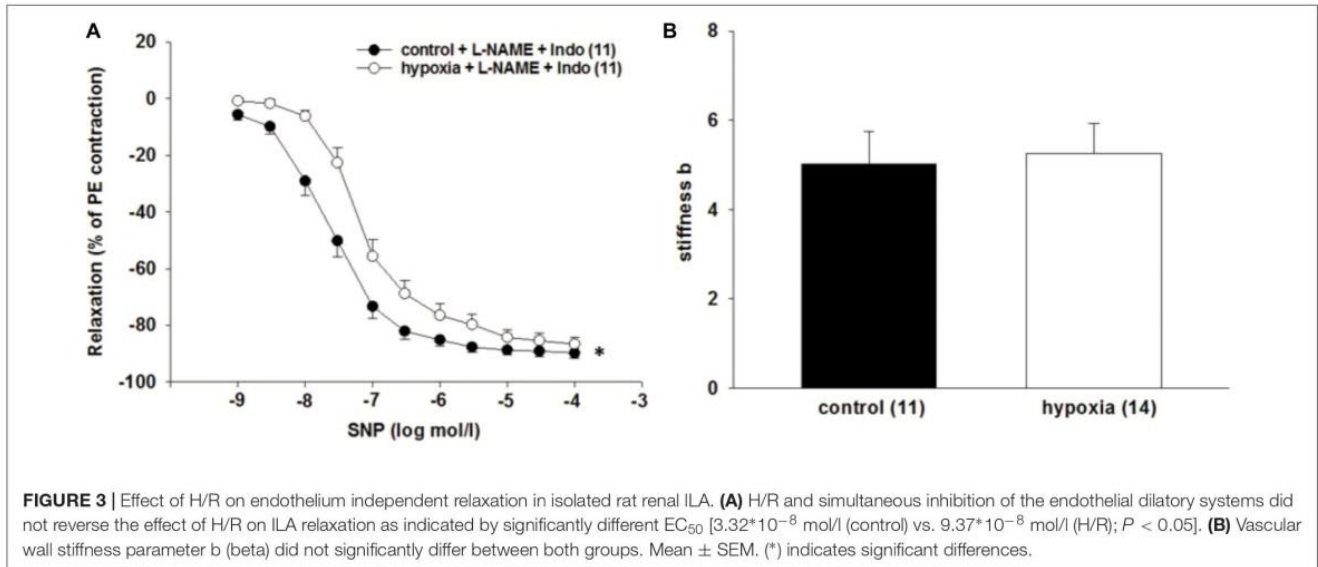
Inhibition of NO synthases (NOS) with L-NAME (10⁻⁴ mol/l) did not reverse the H/R effect [EC₅₀: 3.3*10⁻⁷ mol/l (control) vs. 9.5*10⁻⁷ mol/l (H/R); *P* = 0.004]. However, it significantly reduced the maximum ACh effect [relaxation compared to PE contraction: 62.3 ± 4.9% (control) vs. 36.2 ± 5.2% (H/R); *P* = 0.007 **Figure 2B**]. The COX inhibitor indomethacin (10⁻⁵ mol/l) did not align the concentration–response-relationships of control and H/R [EC₅₀: 1.6*10⁻⁷ mol/l (control) vs. 4.0*10⁻⁷ mol/l (H/R); *P* = 0.005, **Figure 2C**]. Further, neither K_{Ca}3.1 inhibition by TRAM34 [10⁻⁶ mol/l, EC₅₀: 2.0*10⁻⁷ mol/l (control) vs. 4.1*10⁻⁷ mol/l (H/R); *P* = 0.005] nor K_{Ca}2.1 inhibition by UCL1684 [10⁻⁷ mol/l, EC₅₀: 3.5*10⁻⁷ mol/l (control) vs. 2.1*10⁻⁶ mol/l (H/R); *P* = 0.03] eliminated

the inhibitory effect of H/R on ACh-mediated relaxation (**Figure 2D**).

H/R treatment resulted in a significant downregulation of inducible NOS mRNA (0.45-fold; *P* = 0.025) and endothelial NOS mRNA (0.34-fold; *P* = 0.026) in rat ILA (**Figure 2E**).

Impaired Vascular Smooth Muscle Cell Function in Rat Interlobar Arteries After H/R

After excluding that endothelial-dependent vasodilatory systems are responsible for the observed H/R effect, the endothelium-independent relaxation of ILA was investigated by application of the NO donor SNP and simultaneous inhibition of endothelial-dependent dilatory systems. H/R reduced the sensitivity of ILA to SNP during simultaneous inhibition of NOS (L-NAME, 10⁻⁴ mol/l) and COX (indomethacin, 10⁻⁵ mol/l), compared to control condition [EC₅₀: 3.3*10⁻⁸ mol/l (control) vs. 9.4*10⁻⁸ mol/l (H/R); *P* = 0.01, **Figure 3A**], indicating that the H/R effect is independent of NO-bioavailability, but rather depends on an impaired VSMC function. Analysis of the vascular wall stiffness in non-stimulated vessels did not show significant differences between H/R treated and control vessels (**Figure 3B**).



Superoxide Does Not Contribute to the H/R Effect

It was tested whether superoxide contributes to the impaired relaxation of ILA after H/R. The superoxide dismutase mimetic 4-hydroxy-TEMPO (tempol) did not influence the impaired relaxation to SNP during inhibition of the endothelium by L-NAME (10^{-4} mol/l) and indomethacin [10^{-5} mol/l, EC₅₀: 3.3×10^{-8} mol/l (control) vs. 6.8×10^{-8} mol/l (H/R); $P = 0.033$, **Figure 4C**]. Moreover, superoxide concentration measured by DHE fluorescence did not significantly differ between ILA slices from H/R and control conditions and NADPH oxidase enzymes NOX1, NOX2, NOX4 were not differentially expressed following H/R, further indicating no major role of oxidative stress after H/R under these experimental conditions (**Figures 4A,B,D**).

H/R Attenuates the Response to PDE5-Inhibition and Significantly Decreases cGMP Concentration

By using the PDE5 inhibitor sildenafil and the cell-permeable cGMP analog 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cGMP), it was investigated whether the function of key enzymes in cGMP pathway changes under H/R. The relaxation to the PDE5 inhibitor sildenafil (10^{-5} mol/l) was reduced in ILA after H/R compared to control conditions [EC₅₀: 1.2×10^{-6} mol/l (control) vs. 7.1×10^{-6} mol/l (H/R); $P = 0.001$, **Figure 5A**]. 8-Br-cGMP (10^{-6} to 3×10^{-4} mol/l) relaxed ILA similarly under H/R and control conditions (**Figure 5B**).

The cGMP concentrations were lower after H/R compared to the control conditions [0.52 ± 0.04 pmol/ml (control) vs. 0.29 ± 0.05 pmol/ml (H/R); $P = 0.017$; **Figure 5C**]. Moreover, PDE5 mRNA is highly expressed in ILA, but not differentially regulated after H/R rather pointing to a dysregulation of cGMP production (x-fold mRNA expression H/R relative to control: 1.16 ± 0.12 ; $P = 0.396$).

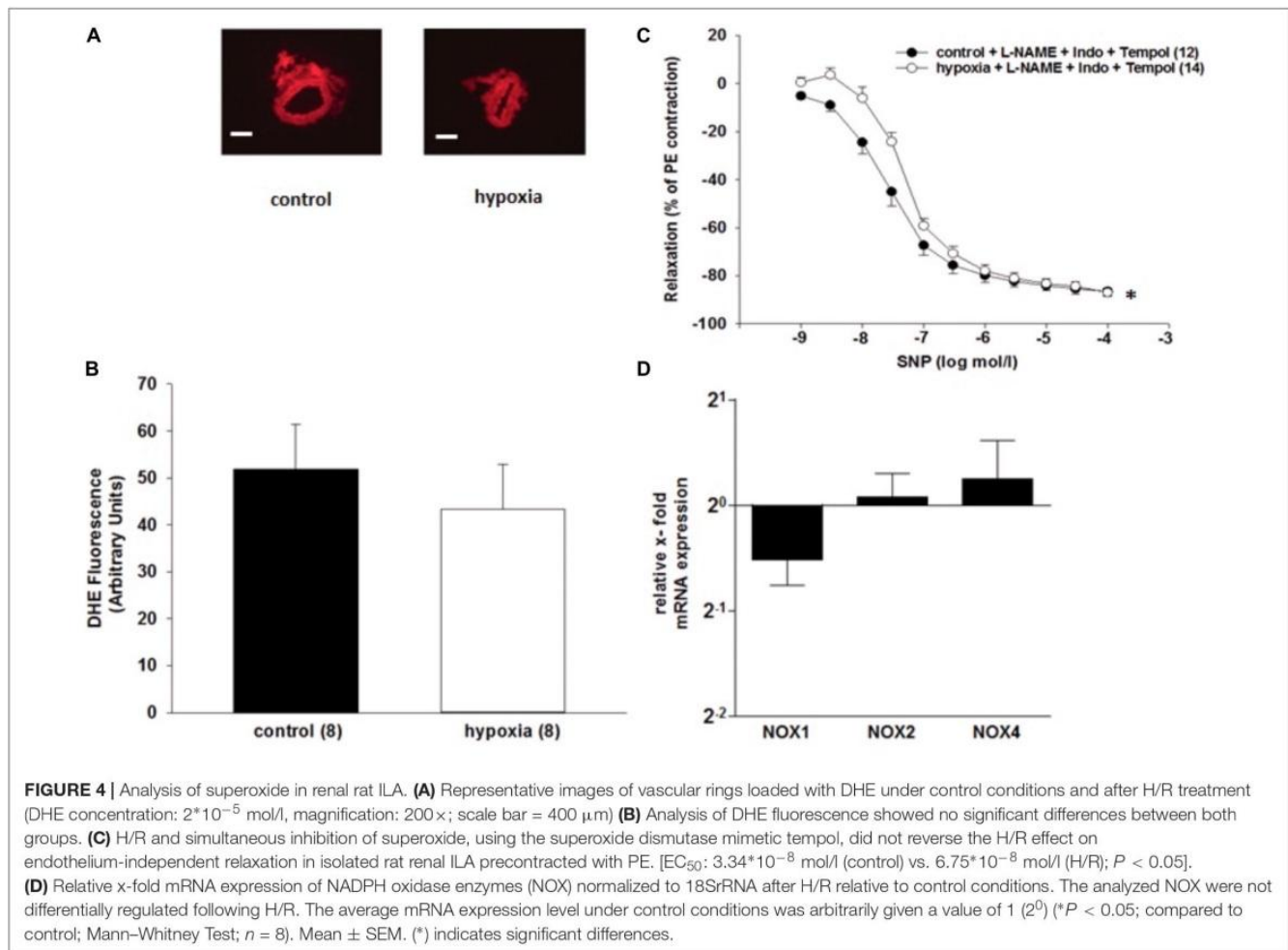
We also tested the role of PKG, which is involved in the NO signaling. SNP was applied while the endothelial dilator function was inhibited by L-NAME (10^{-4} mol/l) and indomethacin (10^{-5} mol/l). PKG inhibition by DT-2 (10^{-7} mol/l) did not affect the impaired relaxation due to H/R [EC₅₀: 2.1×10^{-8} mol/l (control) vs. 4.9×10^{-8} mol/l (H/R); $P = 0.013$, **Figure 6A**].

sGC Inhibition Reverses the H/R Effect on ILA Relaxation

Activation of the sGC enzyme via NO results in cGMP production and vessel relaxation. Therefore, the observed reduced cGMP levels leading to impaired relaxation might be caused by sGC dysfunction. The sensitivity to ACh was similar comparing H/R and control under ODQ treatment [EC₅₀: 8.9×10^{-7} mol/l (control) vs. 1.7×10^{-6} mol/l (H/R), $p = 0.281$]. Thus, inhibition of sGC using the inhibitor ODQ reverses the initially observed H/R effect on relaxation and aligns the concentration-response relationships of control and H/R treatment (**Figure 6B**). **Table 2** summarizes the EC₅₀ and the respective maximum response of the presented small vessel myograph experiments.

DISCUSSION

This study shows that the impaired relaxation of rat ILA to ACh after treatment with H/R, in the presence of physiological level of NE, is mediated by modified signaling in VSMCs. No functional impairment of the endothelial dilatory NOS- and COX-systems as well as EDHF was detected under these experimental conditions. Further, PDE5 and PKG, the downstream target of cGMP, seem not to be responsible for the H/R effect. Noticeably, reduced cGMP concentrations were found after H/R. We demonstrate here that sGC dysfunction caused by H/R results in



impaired relaxation of ILA, which appears independent of NO-bioavailability.

Altered renal perfusion is considered to play a key role in the pathophysiological events following IRI. Renal vessels are effectors as well as targets in the pathophysiological course of ischemia and the subsequent H/R stage. The observation

of increased vasoreactivity of mouse ILA to Ang II after H/R supports the assumption that enhanced vessel tone contributes to IRI (Kaufmann et al., 2015; Braun et al., 2017; Pahlitzsch et al., 2018). Since vascular tone results from the balance of constrictor and dilator systems, it was hypothesized that increased vasoreactivity in H/R may also result from

TABLE 2 | EC₅₀ (mean \pm SEM) and maximum response (mean \pm SEM) of small vessel myograph studies; # indicates $P < 0.05$.

Treatment	EC ₅₀ control (mol/l)	EC ₅₀ hypoxia (mol/l)	Maximum response control (%)	Maximum response hypoxia (%)
ACh-CRC	$2.37 \times 10^{-7} \pm 3.32 \times 10^{-8}$	$4.75 \times 10^{-7} \pm 6.29 \times 10^{-8}$ #	-82.79 ± 3.78	-75.04 ± 2.77
L-NAME+ACh-CRC	$3.33 \times 10^{-7} \pm 4.99 \times 10^{-8}$	$9.54 \times 10^{-7} \pm 2.43 \times 10^{-7}$ #	-62.32 ± 4.86	-36.22 ± 5.22 #
Indo+ACh-CRC	$1.63 \times 10^{-7} \pm 3.23 \times 10^{-8}$	$4.00 \times 10^{-7} \pm 6.43 \times 10^{-8}$ #	-87.78 ± 1.92	-82.06 ± 2.45
TRAM34+ACh-CRC	$2.02 \times 10^{-7} \pm 6.08 \times 10^{-8}$	$4.05 \times 10^{-7} \pm 8.00 \times 10^{-8}$ #	-83.66 ± 1.75	-81.43 ± 2.15
UCL1684+ACh-CRC	$3.52 \times 10^{-7} \pm 6.41 \times 10^{-8}$	$2.07 \times 10^{-6} \pm 1.36 \times 10^{-6}$ #	-87.54 ± 4.51	-76.78 ± 2.77 #
L-NAME+Indo+SNP-CRC	$3.32 \times 10^{-8} \pm 1.00 \times 10^{-8}$	$9.37 \times 10^{-8} \pm 2.70 \times 10^{-8}$ #	-89.77 ± 1.82	-86.63 ± 2.45
L-NAME+Indo+Tempol+SNP-CRC	$3.34 \times 10^{-8} \pm 6.58 \times 10^{-9}$	$6.75 \times 10^{-8} \pm 1.53 \times 10^{-8}$ #	-86.53 ± 2.02	-87.02 ± 1.81
Sildenafil-CRC	$1.18 \times 10^{-6} \pm 3.00 \times 10^{-7}$	$7.14 \times 10^{-6} \pm 2.51 \times 10^{-6}$ #	-89.69 ± 1.91	-89.55 ± 1.30
L-NAME+Indo+DT-2+SNP-CRC	$2.14 \times 10^{-8} \pm 5.45 \times 10^{-9}$	$4.88 \times 10^{-8} \pm 7.91 \times 10^{-9}$ #	-93.37 ± 1.50	-93.64 ± 1.78
ODQ+ACh-CRC	$8.90 \times 10^{-7} \pm 5.34 \times 10^{-7}$	$1.70 \times 10^{-6} \pm 5.68 \times 10^{-7}$	-20.76 ± 6.64	-3.03 ± 5.10

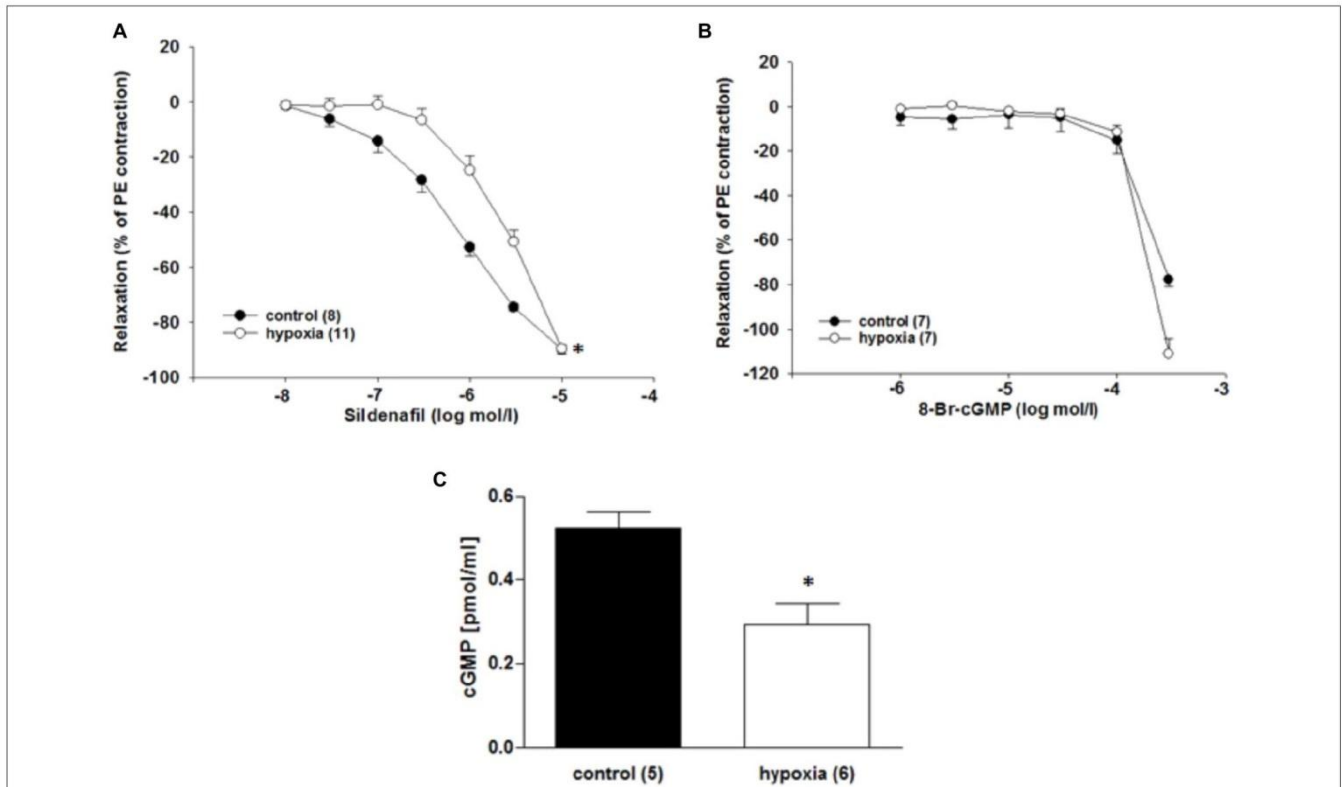


FIGURE 5 | Effect of H/R on the cGMP pathway in rat renal ILA. **(A)** The H/R effect on ILA relaxation was not abolished by PDE5 inhibition using sildenafil as indicated by significant differences in the EC₅₀ [1.18*10⁻⁶ mol/l (control) vs. 7.14*10⁻⁶ mol/l (H/R); *P* < 0.05]. **(B)** The cGMP analog 8-Br-cGMP reversed the H/R effect and abolished significant differences between the two groups. **(C)** H/R significantly decreased cGMP concentration in ILA (*P* < 0.05). Mean ± SEM. (*) indicates significant differences.

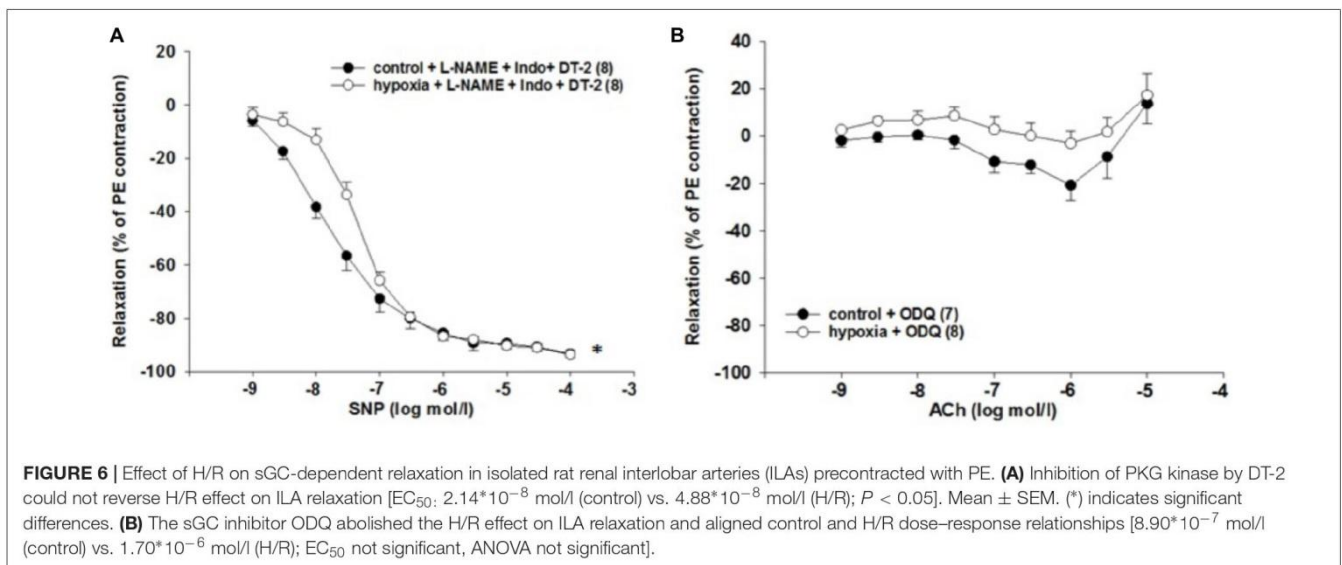


FIGURE 6 | Effect of H/R on sGC-dependent relaxation in isolated rat renal interlobar arteries (ILAs) precontracted with PE. **(A)** Inhibition of PKG kinase by DT-2 could not reverse H/R effect on ILA relaxation [EC₅₀: 2.14*10⁻⁸ mol/l (control) vs. 4.88*10⁻⁸ mol/l (H/R); *P* < 0.05]. Mean ± SEM. (*) indicates significant differences. **(B)** The sGC inhibitor ODQ abolished the H/R effect on ILA relaxation and aligned control and H/R dose–response relationships [8.90*10⁻⁷ mol/l (control) vs. 1.70*10⁻⁶ mol/l (H/R); EC₅₀ not significant, ANOVA not significant].

impaired vasodilator systems, which can mediate relaxation via endothelial-dependent or -independent mechanisms. NO is an important dilatory factor in the kidney and contributes to the ACh-induced renal relaxation (Tai et al., 2004; Patzak and Persson, 2007). Enzymatic blockade of NO synthases by L-NAME

did not prevent the reduced relaxation after H/R compared to control but decreased the sensitivity to ACh similarly in both groups. The maximum relaxation was smaller in H/R compared to control. These results suggest no role of the endothelial NO-system for reduced relaxation in H/R. However,

our functional data point to an enhanced NO-bioavailability at higher ACh concentrations after H/R. As reported in recent studies, increased NO-bioavailability could be the result of an increased NO production from nitrite under hypoxic conditions (Feelisch et al., 2008; Liu et al., 2015). Interestingly, H/R significantly decreased endothelial NOS and inducible NOS expression at the transcriptional level, but this result is limited by the lack of protein expression and activity data. A time-dependent differential mRNA regulation of NOS enzymes cannot be excluded.

Indomethacin, a COX pathways inhibitor, neither affected the relaxation to ACh of ILA, nor influenced the difference in the ACh response between H/R and control. This observation is in line with findings in isolated rat renal arteries and isolated perfused rat afferent arterioles (Wang et al., 2003; Grbovic et al., 2008). In contrast, experiments in anesthetized rats revealed a 20–40% contribution of the indomethacin inhibited systems to the control of renal perfusion (Dautzenberg and Just, 2013). These contrary results may reflect a different function of indomethacin inhibitable systems in the *in vivo* vs. *in vitro* situation as well as different expression of COX in larger arteries vs. arterioles.

Endothelium-derived hyperpolarization has been identified as a factor for renal vessel relaxation (Edgley et al., 2008; Michel et al., 2008; Simonet et al., 2012; Dautzenberg and Just, 2013; Salomonsson et al., 2017). The endothelial hyperpolarization, which is mediated by Ca^{2+} -activated K^+ -channels (K_{Ca}) initializes the EDHF-dilator response. Two K_{Ca} subtypes, namely the intermediate-conductance K_{Ca} ($K_{Ca3.1}$) and the small-conductance K_{Ca} type 2 ($K_{Ca2.1}$) contribute mainly to the hyperpolarization (Grgic et al., 2009). Inhibition of $K_{Ca3.1}$ and $K_{Ca2.1}$ with TRAM34 and UCL 1684, respectively, did not exert significant effects on the ACh concentration–response relationships. Most importantly the differences in ACh sensitivity between the H/R and control group remained, suggesting no significant role of EDHF for the H/R effect. In summary, endothelial-dependent vasodilatory systems are not responsible for diminished relaxation following H/R.

The H/R-induced impairment of relaxation only occurs in vessels treated with low concentration of NE (10^{-9} mol/l) during the hypoxic phase. This concentration is within the range of physiological NE plasma concentrations (Kawada et al., 2014) and did not affect the tone or relaxation to ACh in control vessels. It has been shown that H/R in combination with NE (10^{-9} mol/l) enhanced constriction to Ang II in mouse ILA (Kaufmann et al., 2015). The mechanisms of the combined effect of activation of the sympathetic system and H/R are not well understood.

An incomplete relaxation of rat arterioles in response to the removal of NE treatment ($10^{-5.5}$ mol/l) has been reported (Martinez-Lemus et al., 2004). The incomplete relaxation was interpreted as a mechanoadaptive mechanism of VSMCs to the NE treatment. However, structural changes of ILA following H/R do not appear to be important in the present study. Vessels did not differ regarding vessel stiffness calculated by the parameter beta comparing control and H/R group, indicating similar passive properties.

Previous studies reported enhanced oxidative stress following H/R, which potentiates IRI damage to the kidney and increases

vasoconstriction (Jankauskas et al., 2016; Pahlitzsch et al., 2018). To test if oxidative stress contributed to H/R-mediated vascular dysfunction in the present study, DHE fluorescence was assessed. However, no difference in fluorescence was observed when comparing H/R-treated and control vessels. Furthermore, tempol, a superoxide dismutase mimetic, did not affect the difference in the SNP sensitivity between vessels after H/R and control treatment. NADPH oxidase enzymes were not differentially regulated. Taken together, our data do not indicate a major role of superoxide in this context. However, the involvement of reactive oxygen species other than superoxide cannot be excluded (Huang et al., 2016).

Treatment with the NO donor SNP dilated control vessels in a concentration-dependent manner, and this response was reduced in H/R-treated vessels. This observation locates the mechanisms, by which H/R diminishes relaxation to ACh, in the VSMCs. The main receptor for NO in VSMCs is sGC, which catalyzes the production of cGMP. The latter activates PKG by several cellular mechanisms leading to reduced cytosolic calcium concentration and/or calcium sensitivity of contraction and subsequently to vasodilation. The cGMP concentration results from its production as well as from its degradation by phosphodiesterases (PDE). PDE5 is strongly expressed in ILA and may significantly contribute to the regulation of the cGMP level. Inhibition of PDE5 by sildenafil induced relaxation of vessels in the present study. The sensitivity to sildenafil was reduced after H/R compared to control. To clarify if this reduced sensitivity is due to (i) lower cGMP production by sGC, (ii) changes in PDE5 expression, or (iii) downstream signaling, further experiments were performed. The stable cGMP analog 8-Br-cGMP relaxed control and H/R-treated ILA in a similar way and, in line with previous studies, only at high concentrations (Goulopoulou et al., 2015). Inhibition of PKG, an important kinase downstream of cGMP, did not abolish the differences in SNP responses between H/R and controls further locating the H/R effect to other up- or downstream targets. Moreover, cGMP concentrations were significantly decreased following H/R pointing to disturbed or lower cGMP production by sGC. Therefore, we investigated the effects of sGC inhibition on ILA relaxation using its heme-site inhibitor ODQ. Inhibition of sGC signaling reversed the H/R effect on ILA relaxation pointing to a disturbed sGC signaling. Our results suggest that H/R adversely affects sGC function leading to impaired relaxation in rat ILA.

Due to our *ex vivo* model of isolated vessels, limitations occur in our study, which might influence the interpretation of our results. In contrast to the *in vivo* situation, our vessels are not exposed to a systemic or local renin-angiotensin system (RAS) or secreted substances from surrounding or adjacent cells, which might essentially influence vessel tone. NE was applied to simulate sympathetic activity, as it was found to be crucial for the reproduction of an H/R effect. Currently, there is no adequate model available that offers accessibility of small vessels and at the same time, closely simulates the complex *in vivo* interplay of RAS, sympathetic system, vasoactive substances and vasoreactivity. Therefore, it should be acknowledged that the conclusion reached here refers to isolated vessels and might not be directly transferable to *in vivo* situation.

Moreover, this study is restricted to investigations of the sGC/cGMP pathway and its role in the H/R effect of impaired relaxation. While we could show that sGC dysfunction following H/R leads to diminished relaxation of interlobar arteries, we did not analyze a possible role of adenylatecyclase/cAMP signaling in our experimental setup. It is imaginable that decreased cAMP levels and/or a dysfunction of adenylatecyclase might contribute to the H/R effect. This assumption warrant further investigations.

CONCLUSION

H/R impairs ACh-induced relaxation by an endothelium-independent way in vascular smooth muscles cells. The mechanism whereby H/R induced impaired relaxation may include sGC dysfunction and subsequently decreased cGMP production. The impaired relaxation due to H/R may be a pathogenetic factor for reduced renal perfusion and delayed reperfusion in ischemia reperfusion injury.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have seen and approved the final version of the manuscript. DB, CZ, ML, and SD performed most of the

REFERENCES

- Braun, D., Dietze, S., Pahlitzsch, T. M. J., Wennysia, I. C., Persson, P. B., Ludwig, M., et al. (2017). Short-term hypoxia and vasa recta function in kidney slices. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 67, 475–484. doi: 10.3233/CH-17-9230
- Cantow, K., Flemming, B., Ladwig-Wiegand, M., Persson, P. B., and Seeliger, E. (2017). Low dose nitrite improves reoxygenation following renal ischemia in rats. *Sci. Rep.* 7:14597. doi: 10.1038/s41598-017-15058-5
- Dautzenberg, M., and Just, A. (2013). Temporal characteristics of nitric oxide-, prostaglandin-, and EDHF-mediated components of endothelium-dependent vasodilation in the kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R987–R998. doi: 10.1152/ajpregu.00526.2012
- Denninger, J. W., and Marletta, M. A. (1999). Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 334–350. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00024-9
- Edgley, A. J., Tare, M., Evans, R. G., Skordilis, C., and Parkington, H. C. (2008). In vivo regulation of endothelium-dependent vasodilation in the rat renal circulation and the effect of streptozotocin-induced diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R829–R839. doi: 10.1152/ajpregu.00861.2007
- Feelisch, M., Fernandez, B. O., Bryan, N. S., Garcia-Saura, M. F., Bauer, S., Whitlock, D. R., et al. (2008). Tissue processing of nitrite in hypoxia: an intricate interplay of nitric oxide-generating and -scavenging systems. *J. Biol. Chem.* 283, 33927–33934. doi: 10.1074/jbc.M806654200
- Freslon, J. L., and Giudicelli, J. F. (1983). Compared myocardial and vascular effects of captopril and dihydralazine during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 80, 533–543. doi: 10.1111/j.1476-5381.1983.tb10726.x
- Goulopoulou, S., Hannan, J. L., Matsumoto, T., Ogbi, S., Ergul, A., and Webb, R. C. (2015). Reduced vascular responses to soluble guanylyl cyclase but increased sensitivity to sildenafil in female rats with type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H297–H304. doi: 10.1152/ajpheart.00079.2015
- Grbovic, L., Djokic, J., Radenkovic, M., and Pesic, S. (2008). Analysis of the vasorelaxant action of angiotensin II in the isolated rat renal artery. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 376–384. doi: 10.1254/jphs.FP0071268
- Grgic, I., Kaistha, B. P., Hoyer, J., and Kohler, R. (2009). Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses—relevance to

experiments with arteries and arterial tissue, respectively, the statistical analysis, and contributed intellectually to the writing of the manuscript. SG and HS designed primers, performed qPCR, analyzed and interpreted data, and revised the article for important intellectual content. RS, ML, PP, MC, and AP made substantial contribution to the conception of the article, the data interpretation, drafting of the manuscript, and revised the article for important intellectual content.

FUNDING

The study was supported by a grant of the Sonnenfeld-Stiftung, Berlin, Germany, to DB, and by grants from the German Research Foundation (DFG PA 479/10-1 and PA 479/10-2), the Swedish Heart and Lung Foundation (Dnr: 20140448, 20170124), and the Swedish Research Council (Dnr: 2016-01381).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. A. Gerhardt and Mrs. J. Schmidt for their excellent technical assistance.

- cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 157, 509–526. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x
- Huang, Q., Wang, Q., Zhang, S., Jiang, S., Zhao, L., Yu, L., et al. (2016). Increased hydrogen peroxide impairs angiotensin II contractions of afferent arterioles in mice after renal ischaemia-reperfusion injury. *Acta Physiol.* 218, 136–145. doi: 10.1111/apha.12745
- Jankauskas, S. S., Andrianova, N. V., Alieva, I. B., Prusov, A. N., Matsievsky, D. D., Zorova, L. D., et al. (2016). Dysfunction of kidney endothelium after ischemia/reperfusion and its prevention by mitochondria-targeted antioxidant. *Biochemistry* 81, 1538–1548. doi: 10.1134/S0006297916120154
- Kaufmann, J., Martinka, P., Moede, O., Sendeski, M., Steege, A., Fahling, M., et al. (2015). Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries. *Acta Physiol.* 213, 920–932. doi: 10.1111/apha.12457
- Kawada, T., Akiyama, T., Shimizu, S., Sata, Y., Turner, M. J., Shirai, M., et al. (2014). Acute effects of arterial baroreflex on sympathetic nerve activity and plasma norepinephrine concentration. *Auton. Neurosci.* 186, 62–68. doi: 10.1016/j.autneu.2014.10.016
- Kontogiannis, J., and Burns, K. D. (1998). Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am. J. Physiol.* 274, F79–F90. doi: 10.1152/ajprenal.1998.274.1.F79
- Le Dorze, M., Legrand, M., Payen, D., and Ince, C. (2009). The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr. Opin. Crit. Care.* 15, 503–508. doi: 10.1097/MCC.0b013e32832f6cf
- Liu, M., Zollbrecht, C., Peleli, M., Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Carlstrom, M. (2015). Nitrite-mediated renal vasodilatation is increased during ischemic conditions via cGMP-independent signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 84, 154–160. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.025
- Maringer, K., and Sims-Lucas, S. (2016). The multifaceted role of the renal microvasculature during acute kidney injury. *Pediatr. Nephrol.* 31, 1231–1240. doi: 10.1007/s00467-015-3231-2
- Martinez-Lemus, L. A., Hill, M. A., Bolz, S. S., Pohl, U., and Meininger, G. A. (2004). Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *FASEB J.* 18, 708–710. doi: 10.1096/fj.03-0634fje
- Michel, F. S., Man, G. S., Man, R. Y., and Vanhoutte, P. M. (2008). Hypertension and the absence of EDHF-mediated responses favour endothelium-dependent

- contractions in renal arteries of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 155, 217–226. doi: 10.1038/bjp.2008.256
- Mutoh, J., Ohsawa, M., and Hisa, H. (2014). Involvement of renal sympathetic nerve activation on the progression of ischemic acute kidney injury in the mouse. *J. Pharmacol. Sci.* 125, 415–421. doi: 10.1254/jphs.13234FP
- Nyborg, N. C., Baandrup, U., Mikkelsen, E. O., and Mulvany, M. J. (1987). Active, passive and myogenic characteristics of isolated rat intramural coronary resistance arteries. *Pflugers Arch.* 410, 664–670. doi: 10.1007/BF00581329
- Pahlitzsch, T. M., Liu, Z. Z., Al-Masri, A., Braun, D., Dietze, S., Persson, P. B., et al. (2018). Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 314, F430–F438. doi: 10.1152/ajprenal.00252.2017
- Patschan, D., Patschan, S., and Muller, G. A. (2012). Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *J. Transplant.* 2012:764154. doi: 10.1155/2012/764154
- Patzak, A., and Persson, A. E. (2007). Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16, 46–51. doi: 10.1097/MNH.0b013e328011a89b
- Reuter, S., and Mrowka, R. (2015). Acute kidney injury. *Acta Physiol.* 215, 73–75. doi: 10.1111/apha.12555
- Salomonsson, M., Brasen, J. C., and Sorensen, C. M. (2017). Role of renal vascular potassium channels in physiology and pathophysiology. *Acta Physiol.* 221, 14–31. doi: 10.1111/apha.12882
- Schneider, M. P., Sullivan, J. C., Wach, P. F., Boesen, E. I., Yamamoto, T., Fukai, T., et al. (2010). Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 78, 374–381. doi: 10.1038/ki.2010.141
- Simonet, S., Isabelle, M., Bousquenaud, M., Clavreul, N., Feletou, M., Vayssettes-Courchay, C., et al. (2012). KCa 3.1 channels maintain endothelium-dependent vasodilatation in isolated perfused kidneys of spontaneously hypertensive rats after chronic inhibition of NOS. *Br. J. Pharmacol.* 167, 854–867. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02062.x
- Tai, S. C., Robb, G. B., and Marsden, P. A. (2004). Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 405–412. doi: 10.1161/01.ATV.0000109171.50229.33
- Wang, D., Borrego-Conde, L. J., Falck, J. R., Sharma, K. K., Wilcox, C. S., and Umans, J. G. (2003). Contributions of nitric oxide, EDHF, and EETs to endothelium-dependent relaxation in renal afferent arterioles. *Kidney Int.* 63, 2187–2193. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00036.x

Conflict of Interest Statement: The authors SG and HS were employed by Bayer Pharma AG, Wuppertal, Germany.

The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Braun, Zollbrecht, Dietze, Schubert, Golz, Summer, Persson, Carlström, Ludwig and Patzak. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publikation 2

Diana Braun, Stefanie Dietze, Tamara M.J. Pahlitzsch, Ingrid C. Wennysia,
Pontus B. Persson, Marion Ludwig, Andreas Patzak

Short-term hypoxia and vasa recta function in kidney slices

Clinical Hemorheology and Microcirculation 67 (2017) 475–484
doi 10.3233/CH-179230.

<https://doi.org/10.3233/CH-179230>

Impact Factor: 1.679

Publikation 3

Tamara Pahlitzsch, Zhi Zhao Liu, Amira Al-Masri, Diana Braun, Stefanie Dietze, Pontus B. Persson, Wolf-Hagen Schunck, Maximilian Blum, Ekehardt Kupsch, Marion Ludwig, Andreas Patzak

Hypoxia-reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II

Am J Physiol Renal Physiol. 2018 Mar 1;314(3):F430-F438. doi:
10.1152/ajprenal.00252.2017

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

Impact Factor: 3.611

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

- Diana Braun, Christa Zollbrecht, Stefanie Dietze, Rudolf Schubert, Stefan Golz, Holger Summer, Pontus B. Persson, Mattias Carlström, Marion Ludwig, Andreas Patzak.

Hypoxia/Reoxygenation of Rat Renal Arteries Impairs Vasorelaxation via Modulation of Endothelium-Independent sGC/cGMP/PKG Signaling.

Front Physiol. 2018 May 3;9:480.

Impact Factor: 4.134

- Tamara Pahlitzsch, Zhizhao Liu, Amira Al-Masri, Diana Braun, Stefanie Dietze, Pontus B. Persson, Marion Ludwig, Andreas Patzak.

Hypoxia/re-oxygenation increases the response of afferent arterioles to angiotensin II - Investigation in mouse kidney slices.

Am J Physiol Renal Physiol. 2017 Oct 25, 1;314(3):F430-F438.

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.

Clinical Hemorheology and Microcirculation 67 (2017) 475–484

Impact Factor: 1.679

- Gao X, Liu ZZ, Mohammed H, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlström M, Patzak A, Persson AEG.

Extravasal albumin concentration modulates contractile responses of renal afferent arterioles.

Acta Physiol (Oxf). 2018 Feb;222(2).

Impact Factor: 4.867

- Grisk O, Koenen A, Meissner T, Donner A, Braun D, Steinbach A, Glöckl G, Zimmermann U, Evert K, Evert M, Katsari E, Löhn M, Plettenburg O, Rettig R.

Rho kinase inhibition mitigates sunitinib-induced rise in arterial pressure and renal vascular resistance but not increased renal sodium reabsorption.

J Hypertens. 2014 Nov;32(11):2199-210

Impact Factor: 4.085

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Andreas Patzak, der meine Dissertation betreut hat. Herr Patzak, Sie sind der beste Doktorvater, den man sich überhaupt wünschen kann. Ich danke Ihnen für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit. Jede Phase dieser Arbeit wurde von Ihnen intensiv, professionell und warmherzig begleitet.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. rer. nat. Marion Ludwig. Bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit wurde ich von ihr tatkräftig unterstützt. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Liebe Marion, du bist in den Jahren nicht nur eine sehr gute Kollegin gewesen, sondern wurdest auch zu einer sehr guten Freundin.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. rer. medic. Johanna Schleifenbaum und Stefanie Dietze bedanken, die mir mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Bedanken möchte ich mich für die zahlreichen interessanten Debatten und Ideen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass die Dissertation in dieser Form vorliegt.

Ein herzliches „Dankeschön“ geht auch an unsere technischen Assistentinnen Andrea Gerhard und Jeanette Schmidt, die mich mit viel Geduld und Engagement in die molekularbiologischen Tätigkeiten eingeführt und unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine Mitdoktoranden sowie alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen.

Meinem Freund Oliver und meinen Freunden danke ich besonders für den starken emotionalen Rückhalt über die Dauer meiner gesamten Promotion.

Der Sonnenfeld-Stiftung danke ich für die Vergabe eines Promotionsabschlussstipendiums. Ohne diese finanzielle Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht vollenden können.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich mit ihrer ganzen Liebe erzogen haben und mir meinen gesamten bisherigen Lebensweg durch ihre Unterstützung ermöglichten. Ihr wart immer für mich da und ich konnte immer auf euch zählen.