

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

DISSERTATION

Einfluss extrazellulärer Proteinkonzentration auf die
Reaktivität afferenter Arteriolen der Niere

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hayar Mohammed

aus Duhok

Datum der Promotion: 01.03.2019

Vorwort

Ein Teil der in der vorliegenden Dissertationsschrift dargestellten Ergebnisse wurden 2017 in einem Artikel zusammen mit anderen Autoren in der *Acta Physiologica (Oxf.)* veröffentlicht (Gao X, Liu ZZ, Mohammed H, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlstrom M, Patzak A and Persson AEG, *Acta Physiol (Oxf)*. 2018 Feb;222(2). doi: 10.1111/apha.12925 (45)). Das betrifft Daten der Kontrollgruppe mit 0,1% Albumin und der Osmolalitätskontrolle für den Effekt von erhöhter Albuminkonzentration in der Badlösung auf die Reaktivität afferenter Arteriolen der Maus (Gao X, Liu ZZ, Mohammed H, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlstrom M, Patzak A and Persson AEG, *Acta Physiol (Oxf)*. 2018 Feb;222(2), Abb. 2). Hinsichtlich des Einflusses von Albumin auf die Gefäßreaktivität wurden Experimente teilweise parallel in Uppsala in Schweden und in dem Berliner Institut durchgeführt. Die Daten zum Einfluss von 4% Albumin auf die Angiotensin II-Sensitivität, die in der vorliegenden Schrift dargestellt sind, unterscheiden sich deshalb von den publizierten Daten (Abb. 1).

Die Daten zum Effekt erhöhter Albuminkonzentration in der Badlösung auf die DAF-FM-Fluoreszenz entsprechen genau den publizierten Daten (Gao et al., Abb. 9). Ebenso sind die Proteineffekte auf die Kontraktion von großen Arterien der Maus in dem erwähnten Artikel publiziert (Gao X, Liu ZZ, Mohammed H, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlstrom M, Patzak A and Persson AEG, *Acta Physiol (Oxf)*. 2018 Feb;222(2), Abb. 7).

Die Ergebnisse in glomerulären Mikrogefäßen (afferenten Arteriolen) entstanden mit methodisch/experimenteller Unterstützung von Dr. Zhi Zhao Liu. Die Daten zur Funktion großer Arterien der Maus wurden mit experimenteller Unterstützung von Frau Diana Braun, M.Sc., erhoben.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Einleitung	9
Literaturübersicht.....	10
Funktion der Niere im Elektrolyt- und Wasserhaushalt	10
Osmotischer Druck.....	10
Rolle des juxtaglomerulären Apparates bei der Regulation von Elektrolyt- und Wasserhaushalt.....	13
Herleitung der Fragestellung	20
Hypothese.....	20
Methoden	20
Versuchstiere	20
Präparation und Perfusion der afferenten Arteriolen	21
Videomikroskopie und Analyse.....	23
Messung der Osmolalität der Badlösungen	24
Protokolle	24
DAF-Fluoreszenz der afferenten Arteriole	24
Protokolle	25
Isometrische Untersuchungen an großen renalen Arterien der Maus und Ratte	25
Protokolle	25
Statistik.....	29
Ergebnisse	29
Einfluss extravasaler Proteinkonzentration auf die Reaktivität afferenter Arteriolen	29
Effekt eines erhöhten osmotischen Druckes auf die Funktion afferenter Gefäße	30
DAF-Fluoreszenz in afferenten Arteriolen mit niedriger und hoher Albuminkonzentration in der Badlösung	32
Effekt von 4% Albumin in der Badlösung auf die Kontraktilität und Relaxation von großen Arterien der Mausniere	34
Albumineffekt auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion großer renaler Arterien der Ratte	36
Expression von NOS-Isoformen in afferenten Arteriolen und großen Nierenarterien und der Maus	38

Diskussion.....	40
Methoden	40
Wirkung von 4% Albumin in der Badlösung auf die Reaktivität von Gefäßen	42
Die Rolle von NO für die verstärkte Gefäßreaktivität.....	43
Selektivität des Albuminwirkung	45
Hypothetische Funktion der Albuminwirkung an renalen afferenten Arteriolen für die Regulation des Wasserhaushalts	45
Zusammenfassung.....	46
Literaturverzeichnis	48
Abbildungsverzeichnis:.....	62
Eidesstattliche Versicherung	63
Anteilerklärung an Publikationen	63
Lebenslauf.....	64
Publikationsliste:.....	65

Abkürzungsverzeichnis

A ₁ -, A ₂ -, A ₃ R	Adenosin-Typ 1-, Typ 2-, Typ 3-Rezeptor
ACh	Azetylcholin
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoreszein
EC ₅₀	mittlere effektive Wirkkonzentration
ET _A -, ET _B -Rezeptor	Endothelin-Typ A-, Typ B-Rezeptor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
5-HT ₁ -, 5-HT ₂ - Rezeptor	5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)-Rezeptor Typ 1 und 2
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginin-Methylester
mRNA	„messenger“ oder Boten-Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
nNOS	neuronale NOS, NOS1
iNOS	induzierbare NOS, NOS2
eNOS	endotheliale NOS, NOS3
P1-Rezeptor	Purinerger Rezeptor 1
P2X-Rezeptor	Purinerger Rezeptor 2 Subtyp X
qPCR	quantitative Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
TGF	tubuloglomeruläre Rückkopplung (tubuloglomerular feedback)
TRPV4	„transient receptor potential vallinoid“ Typ 4
V1-, V2-Rezeptoren	Vasopressinrezeptoren Typ 1 und 2

Abstrakt

Die Niere nimmt eine zentrale Stellung bei Regulation des Osmo- und Volumenhaushaltes des Organismus ein. Dehnungsrezeptoren im Niederdrucksystem als auch zentral und peripher gelegene Osmorezeptoren sind an der Regulation durch Beeinflussung der Vasopressinausschüttung beteiligt. Vasopressin fördert den Einbau von Wasserkanälen im Sammelrohr, damit die Wasserresorption, und hemmt die Diurese. Aber auch Änderungen der Filtrationsrate können für die Flüssigkeitsausscheidung eine Rolle spielen. Die Filtrationsrate wird durch den effektiven Filtrationsdruck und unter physiologischen Umständen damit durch den Widerstand afferenter und efferenter Arteriolen bestimmt. Es wurde in Tierexperimenten gezeigt, dass die interstitielle Proteinkonzentration in der Niere vom Hydratationszustand des Körpers abhängt. In der folgenden Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die interstitielle Proteinkonzentration den Tonus und die Reaktivität afferenter Arteriolen moduliert und damit via Änderung der glomerulären Filtrationsrate zur Volumenregulation beitragen könnte.

Zur Testung der Hypothese wurden Experimente an Mäuse- (C57Bl6) und Rattengefäßen (Sprague Dawley) durchgeführt. Der Proteingehalt (Albumin) der Badlösung wurde variiert (proteinfrei, 0,1% oder 4% Albumin). Afferente Arteriolen der Maus wurden isoliert, perfundiert, videomikroskopisch dargestellt und Änderungen des Gefäßdurchmessers auf Angiotensin II bewertet. Mannitol wurde als Kontrolle für osmolare Effekte von Protein eingesetzt. Fluoreszenzuntersuchungen mit DAF-FM ermöglichten die Bewertung der Stickstoffmonoxidverfügbarkeit in den Arteriolen. Die Antwort großer Nierenarterien der Maus und Ratte auf Vasokonstriktoren wurde im Drahtmyographen, isometrisch, bei verschiedenen Proteinkonzentrationen im Bad gemessen, um die Spezifität einer möglichen Proteinwirkung beurteilen zu können. Die Expression endothelialer, induzierbarer und neuronaler Stickstoffmonoxidsynthase wurde auf mRNA-Ebene in den Gefäßen bestimmt.

Wir sahen eine größere Reaktivität afferenter Arteriolen bei 4% Albumin in der Badlösung im Vergleich mit 0,1%. Dieser Effekt konnte durch Mannitol in der Badlösung, welches einen gleichen osmotischen Druck wie bei 4% Albumin entwickelte, simuliert werden. Die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid war bei 4% Albumin im Bad deutlich vermindert. In großen Nierenarterien der Maus waren keine signifikanten Differenzen in den Antworten auf Angiotensin II und Azetylcholin im Vergleich von 0,1% und 4% Albumin zu sehen. Noradrenalinantworten unterschieden sich in großen Nierenarterien der Ratte ebenfalls im Vergleich von 4% Proteinanteil und proteinfreier Lösung nicht. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase-mRNA war deutlich geringer bei 4% Albuminkonzentration exprimiert.

Die Studie zeigt, dass eine erhöhte Proteinkonzentration die Gefäßreaktivität afferenter Arteriolen, aber nicht die von großen Nierengefäßen verstärkt. Die erhöhte Osmolalität und eine verminderte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid vermitteln die Wirkung einer erhöhten Proteinkonzentration. Die Befunde unterstützen die Hypothese eines intrarenalen Mechanismus der Volumenregulation.

Abstract

The kidney is an important part in the control of volume and osmolality in the body. Stretch receptors in the low-pressure system as well as central and peripheral osmoceptors contribute to the control by modulating the vasopressin release in the hypothalamus/pituitary gland. In addition, changes in the glomerular filtration rate may influence the diuresis. The effective filtration pressure is regulated via changes of the resistance of afferent and efferent arterioles. Studies showed that the extracellular protein concentration in the kidney increases with dehydration of the body. We hypothesize that the interstitial protein concentration influences the tone and reactivity of afferent arterioles in the kidney and this may contribute to volume control.

To test the hypothesis, renal vessels of mice (C57Bl6) and rats (Sprague Dawley) were included. The protein concentration (albumin) of the bath solution was varied (protein free, 0.1% or 4% albumin). Mouse afferent arterioles were isolated and perfused. Angiotensin II was applied and the diameter was obtained by using video microscopy. To test for the effect of increased osmolality due to increased protein concentration, mannitol was applied. The fluorescent dye DAF-FM served for estimation of the nitric oxide bioavailability. The function of big renal arteries in presence of different protein concentrations in the bath solution was investigated by using wire myography. The mRNA expression of endothelial, inducible, and neuronal nitric oxide synthase in renal vessels was measured by using the qPCR.

We found an increased reactivity of afferent arterioles to angiotensin II in presence of 4% protein in the bath. This effect could be mimicked by using mannitol instead of protein. The nitric oxide bioavailability was decreased at 4% protein compared to 0.1%. In the big renal arteries, angiotensin II and acetylcholine responses were similar comparing 4% and 0.1% protein concentrations. The response to norepinephrine was similar when using 4% albumin or protein free solution in big renal arteries of rats. The inducible nitric oxide synthase was less expressed in big arteries exposed to 4% albumin compared to 0.1%. Nitric oxide synthases expression did not differ in arterioles.

The study shows that increased protein concentration in the extracellular fluid leads to enhanced angiotensin II reactivity of afferent arterioles, but not big renal arteries. The protein

effect may be due to the elevation in the osmolality of the solution and to reduced nitric oxide bioavailability. The finding supports the hypothesis of an intrarenal mechanism of volume control.

Einleitung

Die Nieren sind auf vielfältige Weise in die homöostatische Regulation des Körpers eingebunden. Als Stellglied der Regulation von Elektrolyt- und Wasserhaushalt ermöglichen sie eine Anpassung an Belastungssituationen wie Wassermangel oder elektrolytarme Ernährung. Sie sorgen ebenso bei Flüssigkeitsbelastung, zum Beispiel beim sozialen Trinken, für einen schnellen Ausgleich des Wasserbestandes, entlasten damit den Kreislauf und halten den osmotischen Druck in engen Grenzen. Die Nieren sind nicht nur Effektor in den vermaschten Regelkreisen von Kreislauf, Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt, sondern können selbst Blutdruck, Harnzusammensetzung und auch Hypoxie detektieren und entsprechende hormonelle und nervale Signalwege aktivieren.

Die beiden Hauptmechanismen der Nierenfunktion, nämlich die Filtration und Resorption, unterliegen verschiedensten vegetativ-neuronalen und hormonellen Einflüssen, wobei der Schwerpunkt der Feinregulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes in den Tubuli zu suchen ist. Immer wieder werden aber auch die Filtration beeinflussende Faktoren, darunter der Tonus der glomerulären Gefäße, als wichtiger Angriffsort dieser Regelkreise diskutiert. Obwohl die Nierendurchblutung und damit auch die Filtration über einen weiten Bereich des arteriellen Mitteldruckes autoreguliert ist, schließt diese Eigenschaft aber eine Modulation wie sie beispielweise von verschiedenen Autoren bei der druckabhängigen Diurese diskutiert wird, nicht aus. Im Zentrum des Geschehens stehen hier die afferenten Arteriolen, deren Widerstand im Zusammenspiel mit den efferenten Arteriolen den Filtrationsdruck und damit die Filtrationsmenge bestimmt. Afferente Arteriolen stehen auch im Dienste der Blutdruckregulation, da sie aus den granulären Zellen druckabhängig Renin freisetzen und damit die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems bestimmen. Diese Arteriolen sind ebenfalls Stellglieder in der tubuloglomerulären Rückkopplung, einem Mechanismus, der die Filtrationsmenge an die Natriumchloridbelastung im distalen Tubulus anpasst. Die Sensoren dieser Natriumchloridmessung liegen in dem Bereich des aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife, der mit dem Glomerulus und den glomerulären Arteriolen in engem Kontakt steht. Afferente und auch efferente Arteriolen unterliegen dem Einfluss des sympathischen Teils des vegetativen Nervensystems, von vasoaktiven Hormonen, sowie zahlreichen para- und autokrinen Substanzen aus dem Bereich des Glomerulus, umgebender Tubuli und des Gefäßendothels selbst. Damit kann die Durchblutungs- und Filtrationsrate, die im Wesentlichen autoreguliert ist, an bestimmte Erfordernisse angepasst werden. In der vorliegenden Arbeit soll erstmals der Einfluss interstitieller Proteinkonzentration, die sich unter anderem in Abhängigkeit von Hydratationszustand des Körpers ändert, untersucht werden.

Literaturübersicht

Funktion der Niere im Elektrolyt- und Wasserhaushalt

Körperwasser

Der Wasseranteil im Körper beträgt bei mittleren Konstitutionstyp 55% bei Frauen und 60% bei Männern. Asthenische oder pyknische Typen haben 5%-10% mehr bzw. weniger Anteil. Der Wasseranteil am Körpergewicht ist bei Kindern höher als beim Erwachsenen. Auch die Verteilung ist altersabhängig. Der interstitielle Teil beträgt beim kleinen Kind ca. 25% während es beim Erwachsenen 15% sind. Auf Plasma- und Zellen verteilen sich 5% bzw. 40% des Gesamtwassers. Der tägliche Umsatz an Wasser ist sehr variabel und hängt unter anderem von der körperlichen Betätigung, den klimatischen Verhältnissen, und sozialen Faktoren ab (112). Er beträgt für einen gesunden Menschen mittleren Alters, bei mittlerer Umgebungstemperatur und Luftfeuchte, sowie durchschnittlicher Ernährung und ohne schwere physische Belastung ca. 3 l. Die Flüssigkeitsaufnahme (Getränke und andere Nahrung) ist aufgrund von Verlusten an Wasser bedingt, die etwa jeweils zu einem Drittel aus der Wasser- bzw. Flüssigkeitsabgabe über die Lungen und die Haut, obligater, sowie fakultativer Harnproduktion bestehen. Unter gleichen Bedingungen besteht die Wasseraufnahme ebenfalls wieder zu Dritteln aus obligater und fakultativer Wasseraufnahme, sowie als Bestandteil von Nahrungsmitteln. Hinzu kommt ein nicht unbedeutender Prozentsatz von Oxidationswasser aus dem Stoffwechsel (145).

Elektrolyte

Die Zusammensetzung der drei wesentlichen Flüssigkeitsräume unterscheidet sich. Intrazellulär ist Kalium das dominierende Kation, Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}), Sulfat (SO_4^{2-}) und Protein sind die wesentlichen anionischen Bestandteile. Im Extrazellulärraum finden sich vor allem Na^+ , Cl^- , und Bikarbonat (HCO_3^-). Im Plasma gibt es zudem einen erwähnenswerten Anteil an negativ geladenen Proteinen. Dagegen ist die Proteinkonzentration im interstitiellen Raum sehr gering. Elektrolyte und Wasser tauschen sich zwischen intravasalem (Plasma) und extravasalem (interstitiellen) Raum verhältnismäßig leicht aus, während die Barriere für Proteine generell höher, organbezogen aber unterschiedlich ist (135).

Osmotischer Druck

Die Gesamtheit aller Elektrolyte im Plasma hat eine osmolale Konzentration von 290 mosmol/kg H_2O . Der osmotische Druck, den sie erzeugen, beträgt 5800 mmHg. Die Elektrolytkonzentrationen im Plasma und interstitieller Flüssigkeit sind gleich und damit auch die osmotischen Drücke. Proteine sind ebenfalls osmotisch wirksam und erzeugen im

Plasma einen kolloidosmotischen Druck von 25 mmHg und im Interstitium, aufgrund der geringeren Konzentration, nur von 5 mmHg (112).

Regulationsmechanismen des Wasserhaushalts

Osmotischer und Wasserbestand des Organismus sind die Determinanten der osmolalen Konzentration. Die Schwankungen der Plasmaosmolalität liegen im Bereich von 1-3%. Beispielweise führt 24 Stunden Wasserentzug zu einer Erhöhung der Osmolalität um 10 mosmol/kg H₂O (49; 142). Wasserzufuhr von ca. 850 ml bei dehydrierten Personen vermindert die Osmolalität innerhalb von 30 min um 6 mosmol/kg (48).

Die Osmolalität wird an verschiedenen Stellen im Körper gemessen. Schon vor ca. 60 Jahren wurden Osmorezeptoren mit Sitz im Gehirn vermutet (158). Zentrale Osmorezeptoren, also Zellen, die osmotische Veränderungen wahrnehmen und darauf mit einer Änderung ihrer Aktionspotentialfrequenz reagieren finden sich im Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) (160), dem Nucleus supraopticus Mason (11; 89), dem Subfornikalorgan (SFO) (143), Area praeoptica (100) und dem kaudalen Teil des Nucleus tractus solitarii (NTS) (69). Der Transduktionsvorgang schließt die Modulation von nichtselektiven Kationkanälen ein. Vermutlich handelt es sich um „transient potential vanilloid“ (TRPV)–Kanäle (105). Sie werden möglicherweise durch einen mechanischen Vorgang, der mit Größen/Formveränderung der Zellen in Zusammenhang steht, aktiviert (174).

Es gibt experimentelle Hinweise für die Existenz von peripheren Osmorezeptoren, die entlang des Verdauungstraktes liegen, als auch in Blutgefäßen. Rezeptoren wurden im Oropharynx (78), im gastrointestinalen Trakt (3), im Mesenterium (23), In der Portalvene (9) und der Leber Adachi (1) beschrieben. Osmorezeptoren werden vom N. Vagus versorgt, ihre molekulare Struktur ist nicht bekannt (12).

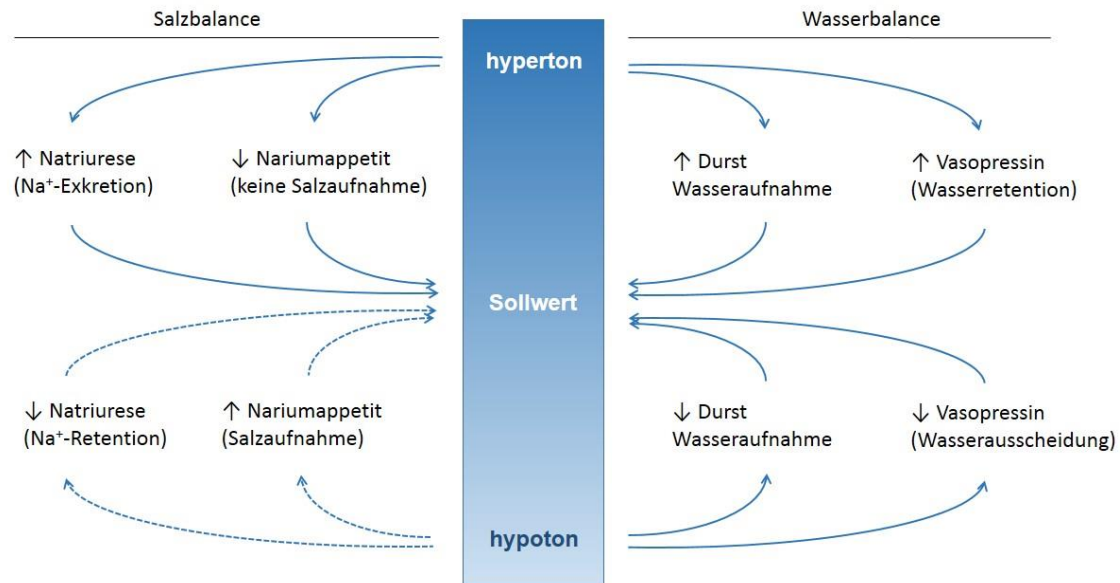


Abb. 1: Die Regulation der Osmolalität nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung. Modulation der Aufnahme oder Ausscheidung von Wasser und Salz entsprechend den osmotischen Verhältnissen in der Extrazellulärflüssigkeit. Die gestrichelten Linien kennzeichnen Wege, für welche die Datenlage nicht sicher ist (nach Bourque CW (12)).

Die Information von zentralen und peripheren Osmorezeptoren wird in verschiedene Hirnareale (oben genannte) projiziert, und mit anderen Signalen, wie zum Beispiel Blutvolumen und Blutdruck integriert. Das führt dann zu einer osmoregulatorischen Aktivität mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der Homöostase. Ein Überblick über die prinzipiellen Regelvorgänge gibt Abb. 1. Die Wasserbalance wird im Wesentlichen über das Durstgefühl und die Stimulation oder Hemmung der Ausscheidung des antidiuretischen Hormons (ADH, Synonym Vasopressin) erreicht. Der Salzgehalt kann über die Veränderung der Aufnahme als auch Abgabe (Exkretion) eingestellt werden.

Die Regulation des Wasserhaushaltes erfolgt zum Beispiel über der Henry-Gauer-Reflex. Im Jahre 1955 haben diese Autoren eine Beziehung zwischen atrialen Dehnungsrezeptoren und der Urinausscheidung gefunden (58). Information über die Dehnung werden von Rezeptoren in beiden Vorhöfen durch vagale Afferenzen letztlich bis in den Hypothalamus gebracht und dort die Produktion und die Ausscheidung via Neurohypophyse moduliert. Flüssigkeitszunahme und damit Dehnung führt zur Hemmung der Ausscheidung von ADH und damit erhöhter Diurese. Vorhofdehnung bewirkt zudem eine verstärkte Ausscheidung von atrialem natriuretischem Hormon, welches über eine gesteigerte Natriumausscheidung über die Nieren zur Volumenverminderung beiträgt.

Der Natriumbestand wird vor allem über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eingestellt. Es ist der wichtigste Mechanismus in der Regulation des Natriumhaushaltes bei moderaten Änderungen. Bei Natriumdefizit kommt es zu einer starken Aktivierung des RAAS mit der Folge einer Aldosteron-vermittelten Natriumrückresorption im distalen Tubulus der Niere. Aldosteron stimuliert auch die Natrium- und Wasser-Rückresorption in den Schweißdrüsen und die Natrium- und Wasser-Rückresorption im Darm. Auch Ang II fördert die Natriumresorption in den Nierentubuli (70). Dieses Protein erzeugt Durst über zentral gelegene Rezeptoren und trägt auch über diesen Weg zur Stabilisierung des Wasseraushalts und des Blutdruckes bei (155). Die Perzeption von Natriumbestandsänderungen ist nicht sicher bekannt; sehr wahrscheinlich tragen verschiedene Mechanismen dazu bei. Der renale Barorezeptor erfasst Änderungen des renalen Perfusionsdruckes, der wiederum vom Blutvolumen und damit Natriumbestand abhängt. Er moduliert die Reninfreisetzung aus den benachbarten juxtaglomerulären (reninbildenden) Zellen. Details dieser Perzeption und Signalübertragung sind nur unvollständig bekannt. Vermutlich perzipieren die reninbildenden Zellen nicht selbst den Druck. Ebenfalls in der Niere wird das Natriumangebot im distalen Tubulus von Macula densa-Zellen erkannt, die einen tonischen Einfluss auf die reninbildenden Zellen und damit auf die Aktivität des RAAS haben (130; 139). Dieser kurze Überblick zeigt, dass Volumen- (Wasser), Elektrolyt- und Osmoregulation durch vermaschte Regelkreise erfolgen, die eine Homöostase der Flüssigkeitsräume gewährleisten.

Rolle des juxtaglomerulären Apparates bei der Regulation von Elektrolyt- und Wasserhaushalt

Die Niere ist auf vielfältige Art und Weise in die Regulation der genannten Größen eingebunden. Sensorische Elemente für intravasalen Druck, Volumen bzw. Natriumbelastung des Harns im distalen Tubulus wurden schon erwähnt. Drucksensoren (intrarenaler Barorezeptor) sind in den afferenten Arteriolen des juxtaglomerulären Apparatus lokalisiert. Obwohl die Verbindung zum RAAS unumstritten ist, bleibt die Natur dieses Sensors unbekannt. Jüngere Arbeiten weisen auf eine Schlüsselrolle von Connexinen, insbesondere Connexin 40, für Transduktion und/oder Transmission des Signals hin (79; 162).

Macula densa Zellen, die ebenfalls zum juxtaglomerulären Apparat zählen, detektieren die Natrium(chlorid)belastung des distalen Tubulus. Langfristige Absenkungen führen zu einer Aktivierung reninbildender Zellen und vermehrten Reninausschüttung. Mediatoren dieser funktionellen Verbindung von Macula densa und reninbildenden Zellen sind vermutlich COX-Produkte (59). Der Mechanismus dient der Regulation von Elektrolyt- und Volumenhaushalt und ist Teil der Blutdruckregulation.

Afferente Arteriolen sind nicht nur Ort der Druckperzeption und der Reninbildung, sondern tragen durch die ihre ausgeprägte myogene Antwort zur Autoregulation der Nierendurchblutung und glomerulären Filtrationsrate bei (101). Die glomeruläre Filtrationsrate wird letztlich im Zusammenspiel von afferenten und efferenten Arteriolen eingestellt.

Kurzfristige Erhöhungen der distalen Natriumchloridbeladung führen zu einer Konstriktion der afferenten Arteriole. Dieser Mechanismus wird tubuloglomeruläre Rückkopplung (TGF) genannt und als ein Schutzmechanismus für akute Natriumchloridverluste interpretiert. Die enge Beziehung von Macula densa Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife und den glomerulären Arteriolen hat schon in den 1950er Jahren zu Spekulationen hinsichtlich funktioneller Beziehungen dieser Strukturen geführt und diese wurde dann experimentell bestätigt (153; 154). In technisch anspruchsvollen Untersuchungen in Tieren konnte mittels Mikropunktionstechnik gezeigt werden, dass ein erhöhter Fluss bzw. erhöhte Natriumchloridkonzentrationen zur Kontraktion der afferenten Arteriole führen (93). Bei dieser „stop flow“ genannten Technik wird ein oberflächlicher Tubulus punktiert und durch einen Wachstopfen verschlossen. Durch eine Pipette auf der distalen Seite kann nun Fluss und Natriumkonzentration moduliert werden, während eine Pipette im proximalen von der Verschlussstelle gelegenen Teil den Druck misst. Da kein Fluss besteht, entspricht dieser Druck dem Druck in der afferenten Arteriole. Dieser wiederum wird vom Gefäßdurchmesser bzw. Tonus bestimmt. Natriumkonzentrationserhöhung führt zur Vasokonstriktion und Druckabfall. Zahlreiche Untersuchungen führen nun zu der Annahme, dass die Informationsübertragung von den Macula densa Zellen zur Arteriole die Freisetzung von ATP und/oder Adenosin aus den Tubuluszellen führt (108). ATP kann über extrazelluläre Enzyme, wie die 5'-Ectonukleotidase in Adenosin gespalten werden. Sowohl purinerge Rezeptoren von Typ P2X für ATP, als auch P1 für Adenosin, können Konstrictionen der afferenten Arteriolen vermitteln (138). Adenosin Typ 1-Rezeptor(A₁R)-defiziente Mäuse zeigen ein stark eingeschränkte TGF, ebenso wie 5'-Ectonukleotidase- oder Ectonukleosidetriphosphatdiphosphohydrolase-1-defiziente Tiere (15; 18; 60; 75; 148). Die TGF leistet einen wichtigen Beitrag zur Autoregulation der Niere, folglich ist diese bei A₁R-defizienten Mäuse eingeschränkt.

Modulation des Tonus/Durchmessers afferenter und efferenter Arteriolen – nervale, endokrine, parakrine und autokrine Faktoren

Glomeruläre Arteriolen haben eine Schlüsselrolle bei der Einstellung renaler Durchblutung und Filtrationsrate. Insbesondere die Funktion afferenter Arteriolen ist hier von Interesse, da sie aufgrund ihrer ausgeprägten myogenen Reaktion auf systemische Druckänderungen schnell reagieren können und auch eine Schutzfunktion vor erhöhtem, also potentiell

schädigendem, Blutdruck für die nachgeschalteten Nierenstrukturen besitzen. Zudem sind afferente Arteriolen Haupteffektoren in der TGF (siehe auch Schnermann (136)). Da die Filtration in enger Beziehung zum Wasser- und Elektrolythaushalt steht, kann die Modulation des glomerulären arteriolen Tonus die Regulation von Volumen und Natriumhaushalt beeinflussen. Auf einige wichtige modulierende Faktoren soll deshalb im Folgenden eingegangen werden.

Vegetatives Nervensystem

Glomeruläre Arteriolen stehen unter dem Einfluss des sympathischen Nervensystems. Tyrosinhydroxylase-positive Axone wurden sowohl in afferenten als auch efferenten Arteriolen gesehen, wobei afferente Gefäße deutlich mehr Aktivität, d.h. neuromuskuläre Verbindungen aufwiesen (88). Bei Verwendung hydronephrotischer Nieren, die eine Mikrogefäßdarstellung erlauben, wurde eine Konstriktion afferenter und, mit einer geringeren Sensitivität, auch efferenter Arteriolen bei Stimulation des Sympathikus gezeigt (22). Noradrenalin konstringiert isoliert perfundierte afferente Arteriolen sowie afferente Arteriolen in der juxtamedullären Präparation von Ratten und Mäusen und führt zur Kontraktion großer renaler Arterien der Maus (61; 64; 73; 85; 172). Die Aktivierung sympathischer Nierennerven beeinflusst letztlich verschiedene Effektoren in der Niere (Tubuli, Blutgefäße und reninbildende Zellen) und steht im Dienst einer koordinierten Nierenfunktion (32). Die Fähigkeit des sympathischen Nervensystems renale Arteriolen zu konstringieren, spielt auch bei der Entstehung akuten Nierenversagens insbesondere in Verbindung mit verschiedenen Schockformen eine Rolle (91; 96).

Adenosine, ATP, Diadenosine

Beide Substanzen konstringieren afferente Arteriolen, wobei Adenosin eine biphasische Antwort erzeugt. Adenosin in höheren Konzentrationen ($>10^{-9}$ mol/l) dilatiert afferente Arteriolen (80; 164; 165). Die biphasische Antwort beruht auf der sequenziellen Interaktion mit zunächst konstriktorisches A_1 -Rezeptoren und dann auch mit dilatatorisch wirkenden A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren (80). Die Interaktion mit A_1 -Rezeptoren ist Teil des Informationsweges von den Macula densa Zellen zu afferenten Arteriolen im Sinne der TGF. Welche Rolle die A_2 -Rezeptoren spielen, ist nicht vollständig geklärt. Denkbar ist ein protektiver Effekt auf die Nierendurchblutung bei Ereignissen, die mit Nierenischämie respektive Nierenhypoxie und vermehrter Adenosinbildung einhergehen (52; 76). Adenosin-Rezeptoren sind vermutlich an der Genese akuten renalen Versagens beteiligt, wobei die Mehrzahl der Befunde für eine protektive Rolle von A_1 - und A_2 -Rezeptoren spricht. Die Funktion von A_3 -Rezeptoren in der Niere ist weitestgehend unbekannt (siehe Rabadi (128)). P2X-Rezeptoren mit denen ATP unter anderem interagiert, sind für Autoregulation der Nierendurchblutung und Filtration von

erheblicher Bedeutung. ATP wird, wie oben erwähnt als Mediator der TGF stark diskutiert (53). Auch A_3 -Rezeptoren sind in der Niere exprimiert und haben möglicherweise dilatierende Wirkung auf afferente Arteriolen (87).

Diadenosinpolyphosphate, deren Stoffwechsel und Funktion bisher nur wenig bekannt ist, können afferente Gefäße konstringieren. Für Diadenosinpentaphosphat wurde auch gezeigt, dass es von Kontrastmittelgeschädigten Tubuli freigesetzt werden kann und damit an der Pathogenese von akutem Nierenversagen beteiligt sein könnte (114).

Angiotensin II

Dieses Peptid findet sich in der Niere in vergleichsweise höheren Konzentrationen als im übrigen Körper. Es hat auf Nierenarterien und -arteriolen konstriktorische Effekte, die in den kleineren Gefäßen stärker ausgeprägt sind. Angiotensin II spielt nicht nur bei der Regulation der Nierendurchblutung- und Filtration eine Rolle, sondern fördert selbst die Natriumresorption im den Tubuli. Insgesamt sind die Effekte volumenerhöhend und blutdruckstabilisierend.

Die starke gefäßkonstringierende Wirkung von Angiotensin II wurde in zahlreichen Experimenten am instrumentierten Tier, im Modell der Hydronephrose, der juxtamedullären Präparation und auch in isolierten Gefäßen gezeigt (2; 63; 74; 102; 111; 132; 161). Es nicht ganz klar, ob es eine differentielle Wirkung von Angiotensin II auf afferente bzw. efferente Arteriolen gibt und wie diese dann aussieht. Speziesunterschiede und Unterschiede in der Messmethode können für die uneinheitlichen Ergebnisse verantwortlich sein (30; 31; 68; 97; 109; 146; 150; 172). Angiotensin II ist ein Vasokonstriktor, aktiviert aber auch dilatorische Systeme unter anderem via Stickstoffmonoxid(NO)-freisetzung und antagonisiert damit zum Teil seine konstriktorische Wirkung. Unterschiede in der NO-Verfügbarkeit zwischen afferenten und efferenten Arteriolen könnten somit Ursache unterschiedlicher Angiotensin II-Wirkung an diesen Gefäßen sein (36; 67; 116; 119). Angiotensin II wirkt inflammatorisch und profibrotisch und trägt zum Gefäß- und Nierenumbau bei Erkrankungen mit erhöhter RAAS-Aktivität bei (113). Angiotensin II entfaltet die Mehrzahl seiner Wirkungen über Angiotensin-Typ 1(AT_1)- Rezeptoren. Blockade dieses Rezeptors bzw. des RAS hat antihypertensive, antiinflammatorische, antifibrotische und antiproliferative Wirkungen in den meisten Untersuchungen und wird klinisch breit angewendet (113). AT_2 -Rezeptoren spielen vor allem der embryonalen Entwicklung und in der Postnatalperiode eine Rolle (129). Es gibt Hinweise darauf, dass der AT_2 -Rezeptor die AT_1 -vermittelten negativen Effekte bei Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen aufheben kann. Die Datenlage zur Wirkung von AT_2 -Rezeptorstimulation in diesem Zusammenhang ist jedoch nicht eindeutig (siehe (90; 167).

Endothelin

Dieses Peptid, welches in drei Isoformen (Endothelin 1, -2 und -3) vorkommt und vor allem im Endothel gebildet wird, ist ebenfalls ein starker Vasokonstriktor (170). Endothelinapplikation führt zur Erhöhung des renalen Widerstands und Abfall der renalen Durchblutung (72; 126). Dies weist auf eine überwiegend vasokonstriktorische Wirkung von Endothelin hin. Endothelin interagiert mit Endothelin A (ET_A)- und ET_B-Rezeptoren. ET_A-Rezeptoren sind überwiegend in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert. ET_B-Rezeptoren finden sich auf Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (41; 166). ET_B-Rezeptoren vermitteln überwiegend Vasodilatation, allerdings wurden in einigen Studien auch konstriktorische Eigenschaften gesehen. ET_A-Rezeptoraktivierung führt überwiegend zur Konstriktion. In einer Studie wurden jedoch auch dilatatorische Eigenschaften gesehen (134). Ob es diese Vielfalt an Expressionsmuster und damit vasoaktiven Funktionen tatsächlich gibt, ist nicht ganz klar. Die in den Studien verwendeten Antagonisten und Agonisten dieser Rezeptoren sind nicht hundertprozentig spezifisch. Speziesunterschiede könnten auch zu den nicht ganz einheitlichen Vorstellungen hinsichtlich der Rezeptorfunktion beitragen (66; 134). Expression und möglicherweise Aktion von Endothelin differieren im Vergleich von afferenten und efferenten Arteriolen. In Mäusen wurde eine stärkere Konstriktion auf Endothelin-1 in afferenten Arteriolen im Vergleich zu efferenten gefunden (134). ET_B-Rezeptoren spielen in afferente Arteriolen vermutlich keine Rolle, während sie in efferenten Konstriktion vermitteln und den basalen Durchmesser der Gefäße über NO-Freisetzung beeinflussen. In afferenten Arteriolen der Ratte hat der ET_B-Rezeptor dagegen eine konstriktorische Wirkung (66). Eine Reihe von Befunden lässt auch eine Rolle endogenen Endothelins bei der Entstehung von Nierenerkrankungen vermuten (14; 20; 34; 50; 83).

Aldosteron, Vasopressin

Zwei Hormone, welche in die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts eingebunden sind, können afferente Arteriolen über nichtgenomische Wege direkt beeinflussen. Für Aldosteron sind vasokonstriktorische Eigenschaften bei gleichzeitiger Aktivierung von NO-vermittelter Dilatation beobachtet worden (5; 157). Aldosteron beeinflusst die Funktion des juxtaglomerulären Apparates auch über die Stimulation der Superoxidproduktion in den Macula densa Zellen (175). Andere Arbeiten zeigen eine Freisetzung von NO durch Aldosteron via Mineralokortikoidrezeptoren in Macula densa-Zellen (44).

Die Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung von Vasopressin bzw. Arginin-Vasopressin in renalen Gefäßen ist nicht ganz eindeutig. Es wurden Reaktionen größerer Gefäße, aber auch von Arteriolen in hydronephrotischen Präparationen sowie in „arteriolar casts“ gesehen (19; 26). In isoliert perfundierten afferenten Arteriolen von Kaninchen induzierte Vasopressin

eine Konstriktion via V1-Rezeptoren und entwickelte dilatatorische Eigenschaften via V2-Rezeptoren (151). In juxtamedullären Nephron-Präparationen führte Arginin-Vasopressin-Applikation zur Konstriktion afferenter Arteriolen (55). Die Mechanismen der konstriktorischen Aktion sind teilweise bekannt. In afferenten Arteriolen spielen vor allem spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle eine Rolle, während in efferenten Arteriolen die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern im Vordergrund steht (38).

Histamin, Serotonin

In hydronephrotischen Nierenpräparationen versuchte Serotonin(5-HT)-Gabe eine Konstriktion größerer Gefäße durch Aktivierung von 5HT2-Rezeptoren, bei gleichzeitiger Dilatation von Arteriolen, die möglicherweise durch 5-HT1-Rezeptoren vermittelt wird. Serotonin verschlechterte in diesen Experimenten die Autoregulation der Niere (37). Die 5-HT2-Rezeptor-Rolle bei der Vasokonstriktion renaler Gefäße wird auch durch *in vivo* Arbeiten unterstützt (92). Serotonin ist an der Entstehung der diabetischen Nephropathie beteiligt. Ein therapeutischer Effekt von 5-HT2-Rezeptor-Antagonisten wurde diskutiert (33). Histamin entwickelt in verschiedensten Gefäßgebieten inklusive der Niere dilatatorische Wirkungen (57). Es wird aus Mastzellen und basophilen Granulozyten freigesetzt und ist wichtiger Modulator des Gefäßtonus bei allergischen Reaktionen. In der isoliert perfundierten Niere der Ratte war die histamininduzierte Dilatation durch L-NAME nicht hemmbar, was auf einen NO-unabhängigen Mechanismus in diesen Gefäßen hinweist (81). Die Histaminwirkung an Nierengefäßen hat klinische Bedeutung. Therapie mit Histaminrezeptorantagonisten kann eine schon eingeschränkte Nierenfunktion verschlechtern (10).

NO, COX- und P450-Produkte, EDHF

NO ist ein wichtiger Vasodilatator in der Niere. Zahlreiche Studien fanden eine Erhöhung des renalen Widerstandes bzw. Verminderung der Nierendurchblutung bei Inhibition der NO-Synthase mit L-NAME (siehe (119)). Langfristige Gabe von L-NAME kann Nieren schädigen und führt in Kombination mit Angiotensin II zu chronischen Nierenschäden. NO wird in der gesunden Niere von der endothelialen NO-Synthase (eNOS), lokalisiert im Gefäßendothel, und der neuronalen NO-Synthase (nNOS), die vor allem in den Macula densa-Zellen exprimiert wird, gebildet (8; 95). Hinzu kommt eine funktionell wirksame Produktion im Nierenmark mit Einfluss auf die Funktion der Vasa recta und Nierentubuli (28). Glomeruläre Arteriolen unterliegen dem Einfluss sowohl des endothelial als auch nNOS-gebildeten NO. Experimente unter Verwendung von eNOS- und nNOS-defizienten Tieren weisen auf einen stärkeren Einfluss von endothelalem NO im isoliert perfundierten juxtaglomerulären Apparat hin (120). NO aus Macula densa-Zellen moduliert die TGF (122). Trotz dieser zahlreichen

Befunde, die auf eine große Rolle von NO in der Regulation von glomerulärer Filtrationsrate, Elektrolyt- und Wasserhaushalt und möglicherweise bei der Entstehung einer arteriellen Hypertonie hinweisen, zeigen eNOS- und nNOS-defiziente Tiere nur moderate Änderungen in funktionellen Parametern des Kreislaufs und in der Gefäßfunktion. Dies ist auch auf die kompensatorisch verstärkte Funktion von Isoenzymen der NOS und anderer dilatatorischer Systeme zurückzuführen (51; 147). Experimentelle Befunde zeigen, dass NO-Mangel an der Genese von akutem und chronischem Nierenversagen beteiligt ist (99).

Zyklooxygenase-Produkte haben konstriktorische und dilatatorische Effekte in renalen Arteriolen. In Angiotensin II-behandelten Kaninchen ist die erhöhte Vasoreaktivität vermutlich auf COX1- und COX2-gebildete Prostaglandine zurückzuführen (163). Hydroxyeicosatetraensäuren sind an der NO-unabhängigen Bradykinin-induzierten Dilatation von afferenten Arteriolen der Ratte beteiligt (62; 65). Der Durchmesser efferenter Arteriolen wird vermutlich durch COX-Produkte beeinflusst, die aus dem Bereich des Glomerulus kommen und durch Bradykinin aktiviert werden. Auch Zytochrome-P450-Derivate sind an der Regulation des Widerstandes efferenter Arteriolen beteiligt (131).

Reaktive Sauerstoffspezies

Radikale entstehen infolge verschiedenster chemischer Vorgänge im Organismus. Sie sind schnelllebig. Zu den Sauerstoffradikalen zählen vor allem Superoxid (Hyperoxidanion), Hydroxylradikal, Wasserstoffperoxid und Reaktionsprodukte wie zum Beispiel Peroxynitrit. Hauptorte der Radikalentstehung sind die Mitochondrien, aber auch zytosolische Enzyme können Radikale bilden. Dazu gehören die NADPH-Oxidasen (54). Eine Verschiebung des Gleichgewichts von Radikalbildnern und Radikalfängern zugunsten ersterer führt zu oxidativem Stress. Radikale sind nicht nur Nebenprodukt biochemischer Vorgänge sondern werden von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen für die Abwehr von Bakterien eingesetzt und sie sind auch Signalstoffe (7; 35). NADPH-Oxidasen sind in die kontraktile Antwort von afferenten Arteriolen auf Angiotensin II, Adenosin und Endothelin-1 involviert (17; 40). Zahlreiche Arbeiten belegen die modulierende Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies für die Funktion des juxtaglomerulären Apparates (168; 169). NOX2 ist verantwortlich für die NaCl-induzierte Superoxidgenerierung in den Macula densa-Zellen (84; 173). Radikale verstärken die TGF. Dies kann eine Ursache für die Entwicklung arterieller Hypertonie sein (168; 169).

Diese komprimierte Darstellung wichtiger vasoaktiver Stoffe und Signalwege von Kontraktion und Dilatation glomerulärer Arteriolen zeigt, dass der Einfluss auf den Tonus/Durchmesser dieser Gefäße vielfältigen Ursprungs ist.

Herleitung der Fragestellung

Änderungen des Volumens im Extrazellulärraum beeinflussen die Sensitivität der TGF, bei der afferente und möglicherweise efferente Arteriolen wichtige Stellglieder sind (124). Die TGF ist in Tieren mit Dehydratation verstärkt, während sie in Tieren mit Volumenerhöhung vermindert ist (124; 140). Es gibt Hinweise darauf, dass eine variable NO-Bioverfügbarkeit in den Arteriolen dafür verantwortlich ist (16). Die Änderungen extrazellulären Volumens gehen auch mit Änderungen der Proteinkonzentration im Interstitium einher. Diese liegen in der Rattenniere zwischen 0,7g% (Volumenexpansion) und etwa 3% bei Dehydratation (141). In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie die extrazelluläre Proteinkonzentration die Funktion von afferenten Arteriolen beeinflusst. Dies könnte einen weiteren Mechanismus der Volumenregulation darstellen.

Hypothese

Die Haupthypothese der vorliegenden Arbeit ist die Annahme einer vasokonstriktorischen Wirkung von erhöhter extravasaler (respektive interstitieller) Proteinkonzentration auf afferente Arteriolen der Niere.

Methoden

Versuchstiere

Es wurden männliche C57BL6-Mäuse im Alter von 3 bis 6 Monaten und einem Körpergewicht von 25-35 g (Tierexperimentelle Einrichtung der Charité) sowie Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 350g (Charles River, Deutschland) verwendet. Alle Tiere wurden in gemeinsamer Käfighaltung in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité am Campus Mitte (CCM) in der Zeit zwischen Lieferung und Experiment gehalten. Sie wurden mit Standard-Pressfutter ernährt und hatten freien Zugang zu Wasser. Es wurde ein 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus eingehalten.

Tierhaltung und Verwendung fanden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes vom 01.01.1987, herausgegeben vom Bundesministerium der Justiz, statt. Die Tötung der Tiere wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales des Bundeslandes Berlin (LAGeSo) angezeigt (Behördliche Nummern: T 003/06, T 016/08).

Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden beachtet.

Präparation und Perfusion der afferenten Arteriolen

Die Mäuse wurden getötet und die Nieren entnommen. Der Hilus wurde durch einen Schnitt mit einer langen Rasierklinge („blades for Triumph scrapers“, Jydsk Barberblade-Fabrik A/S, Aalborg, Dänemark) entfernt und die Nierenkapsel abgezogen. Die Nieren wurden quer zur Längsachse in mehrere millimeterdicke Schnitte geteilt und diese in DMEM-Lösung (Dulbecco's modified Eagle's medium F12, 15 mM HEPES und Natriumbikarbonat, Sigma-Aldrich, Deutschland) und in einem eisgefüllten Behälter gelagert. Aus dem Vorrat des Nierenmaterials wurde eine einzelne Schnitte entnommen und für die Präparation bereitgestellt. Diese erfolgte in 4°C-gekühlter DMEM-Lösung. Die Temperatur dieser Lösung wurde durch eine Regelschaltung, die ein Peltierelement steuerte, gewährleistet (Werkstätten der Charité). Die Präparation erfolgte unter Hilfenahme eines Mikroskops (SMT 4, Askania Mikroskoptechnik Rathenow, Deutschland) bei bis zu 200facher optischer Vergrößerung. Afferente Arteriolen und der zugehörige Glomerulus wurden mit feinen Pinzetten (DUMONT-Pinzette Nr. 5, gerade), die unter dem Mikroskop per Hand auf einem Schleifstein („White Arkansas“) in die passende Form gebracht wurden, präpariert. Arteriolen mit Glomerulus entstammten dem mittleren bis äußeren Teil der Rinde. Sie wurden mittels einer proteinbenetzten Glaspipette in eine thermostatierte Organkammer (Firma Vetec, Rostock, Deutschland) mit einem Volumen von 2 ml überführt. Diese befand sich auf dem Tisch eines Mikroskops umgekehrter Bauweise (Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Die Perfusion der Arteriolen erfolgte durch selbst geformte Pipetten (Glasröhrchen von Vestavia Scientific, Vestavia Hills, Ala, USA). Die äußere Pipette hatte eine Öffnung von ca. 26 μm , die innere Pipette einen Außendurchmesser an der Spitze von 5 μm . Haltepipette und Perfusionspipette wurden so ineinander gesetzt und justiert, dass die Arteriole am freien Ende gehalten und zugleich perfundiert werden konnte. Dieses Perfusionssystem (Firma Luigs&Neumann, Ratingen, Deutschland) zum Füllen der Pipetten, Erzeugung des Unterdrucks zum Halten der Arteriole, zur Perfusion via innere Pipette sowie zum Lösungswechsel durch eine weitere, in der inneren Pipette gelagerten Austauschpipette, war an Mikromanipulatoren befestigt, die in x,y,z-Richtung über Schrittmotoren und Steuerelemente bedient wurden (Abb. 2). Ein weiteres System wurde zum Halten der glomerulären Seite des Präparates benutzt, so dass eine stabilere Perfusionssituation in der Kammer erreicht werden konnte. Die Perfusion erfolgte über die Austauschpipette, welche die Perfusionslösung von einem Vorratsbehälter mit einem Druck von 100 mmHg in die innere Pipette führte. Der Druck in der Spitze der inneren Pipette genügte für eine deutliche Aufweitung der Arteriole. Der Lösungsfluss durch die Arteriole betrug etwa 50 nl/min (117) und lag damit in einem physiologischen Bereich. Die Temperatur in der Kammer wurde auf

37°C stabil eingestellt und fortlaufend automatisch reguliert. Die Perfusionslösung bestand aus DMEM-Lösung, die einen 1%igen Albuminanteil (Bovine Serum Albumin-Fraction V, Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland) hatte. Die Badlösung war ebenfalls DMEM-Lösung, jedoch mit 0,1% Albumin. Es wurden nur Arteriolen für die Studie verwendet, die nicht später als 90 min nach Tötung des Tieres erfolgreich perfundiert waren.

Arteriolen wurden hinsichtlich des Bestehens eines Tonus und der Reaktivität auf KCl (100 mmol KCl-haltige Lösung: (in mmol/l) NaCl 20; KCl 95; NaHCO₃ 25; K₂HPO₄ 2,5; CaCl₂ 1,3; MgSO₄ 1,2; Glukose 5,5; HEPES 10) getestet. Dabei wurde der Druck in der Arteriole kurz erhöht und die Durchmesseränderung bewertet. Arteriolen, die sich hier stark erweiterten, wurden ausgeschlossen. KCl-Lösung, für einige Sekunden appliziert, musste zu einer kompletten Konstriktion mit Verschluss des Gefäßlumens führen. Das Gefäß wurde sonst aus der Studie ausgeschlossen.

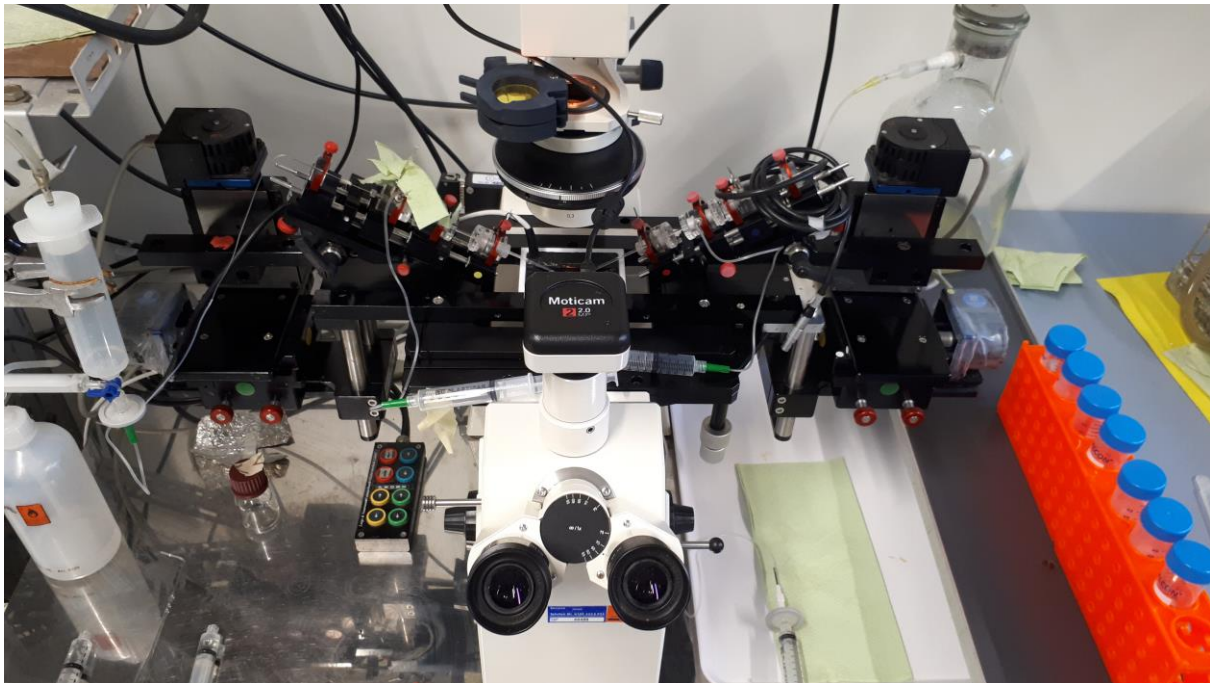


Abb. 2: Experimenteller Aufbau mit Blick auf die Mikroperfusionseinrichtung, die auf einem Mikroskop umgekehrter Bauweise montiert ist. In der Mitte erkennt man die Perfusionskammer. Links und rechts befinden sich Perfusionssysteme mit den in die Kammer reichenden Pipetten. Die Perfusionssysteme werden mit xyz-Mikromanipulatoren in μm -Schritten bewegt. Im Vordergrund sieht man die Kamera (Moticam) für die videomikroskopischen Aufnahmen. Links im Bild erkennt man das Druckreservoir mit Perfusionsflüssigkeit in einer 50 ml Spritze.

Videomikroskopie und Analyse

Mittels Videomikroskopie (Videokamera Moticam 2.0 MP, Motic Asia, Hong Kong) und unter Verwendung eines Objektivs LD-A-Plan 40x ∞ /1,0 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden die Arteriolen dargestellt. Pro Ereignis wurden fünf Videobilder gespeichert und „off line“ mit dem Programm „ImageJ“ (National Institutes of Health, USA) analysiert. Das System wurde mit Hilfe einer Mikrometerskalierung auf einem Objektträger kalibriert. Die Endvergrößerung auf dem Computerbildschirm war ca. 1000fach. Für die Bewertung der isotonischen Kontraktion der Gefäße wurden die luminalen Durchmesser gemessen (Abb. 3). Jeweils Messungen von fünf Bildern eines Ereignisses wurden gemittelt, um Messfehler zu verringern. Der so ermittelte Wert repräsentierte ein Ereignis (z.B. eine Konstriktion infolge Agonistenapplikation).

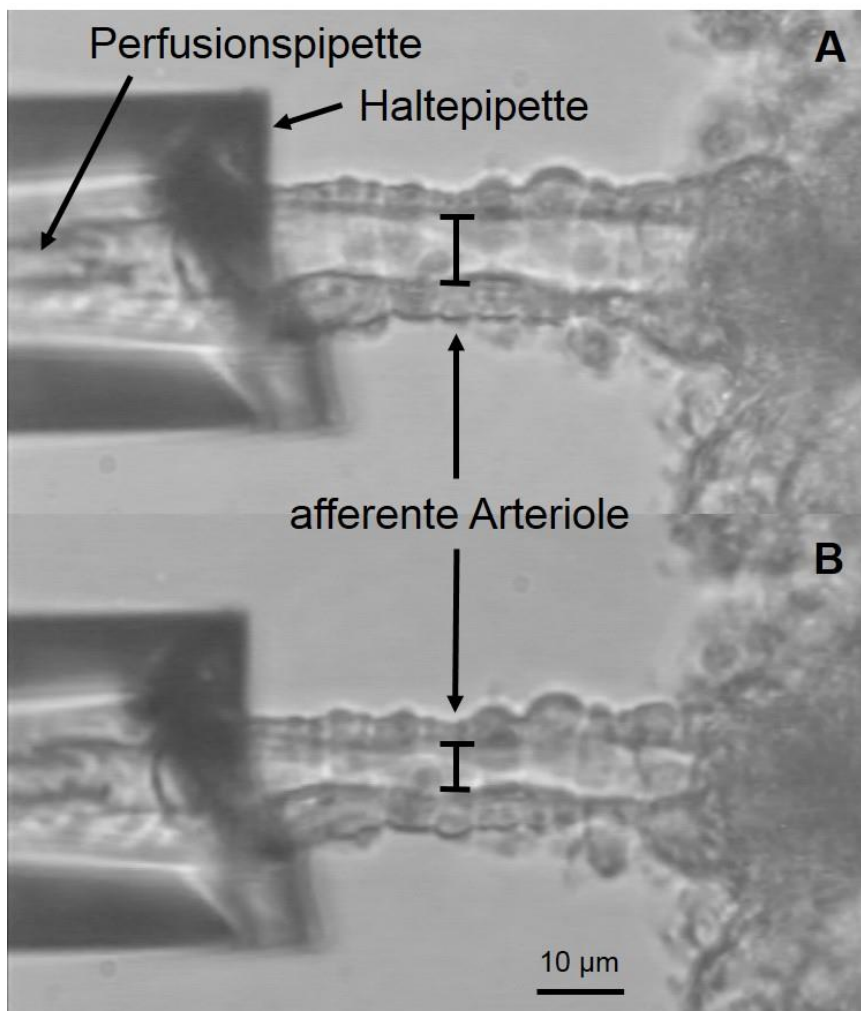


Abb. 3: Videomikroskopisches Bild einer perfundierten afferenten Arteriole der Mausnieren. A: Zustand nach Temperaturadaptation ohne pharmakologische Beeinflussung. B: Konstriktion des Gefäßes nach Austausch der Badlösung mit einer Angiotensin II-DMEM-Lösung (10^{-8} mol/l Angiotensin II).

Messung der Osmolalität der Badlösungen

Es wurden Lösungen mit 0,1% und 4% Albumin in DMEM-Lösung bzw. eine Mannitol-haltige DMEM-Lösung hergestellt und die Osmolalität dieser Lösungen mit Hilfe der Gefrierpunktniedrigung gemessen (Type 15 Osmometer, Löser Messtechnik, Berlin).

Protokolle

Effekt einer erhöhten Albuminkonzentration in der Badlösung auf den Ruhedurchmesser und Gefäßreaktivität

Die Arteriole wurde erwärmt (ca. 10 min) und mögliche Reaktionen darauf protokolliert. Dann wurde KCl (100 mmol/l in physiologischer Lösung) verabreicht. Nach Bestehen des KCl-Tests folgte eine weitere Adaptationsperiode von ca. 10 min. Dann wurde in der Experimentalgruppe DMEM mit 4% Albumin von der Badseite her verabreicht. Im Laufe der nächsten 20 min wurden videomikroskopisch, in Abständen von 5 min, jeweils fünf Bilder gespeichert. In der Kontrollgruppe erfolgte ein Lösungswechsel mit 0,1%-Albumin-DMEM-Lösung. Im Anschluss wurde die Badlösung durch Angiotensin II-DMEM-Lösung (4% oder 0,1% Albumin) mit steigenden Angiotensin II-Konzentrationen (10^{-12} – 10^{-6} mol/l) alle 2 min ausgetauscht. Die fünf videomikroskopischen Bilder wurden jeweils 1 min 45 sec nach dem jeweiligen Lösungswechsel aufgenommen.

Effekt eines erhöhten Osmolalität der Badlösung auf die Reaktivität der afferenten Arteriole

Das Vorgehen entspricht im Wesentlichen dem vorhergehenden Protokoll. Es wurde eine Angiotensin II-Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Mannitol-haltiger DMEM-Lösung gemessen, deren Osmolalität derjenigen der 4%igen Albuminlösung entsprach.

DAF-Fluoreszenz der afferenten Arteriole

Die Bioverfügbarkeit von NO in den afferenten Arteriolen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoreszein (DAF-FM) Diazetat bestimmt. DAF-FM wurde in DMSO gelöst (10^{-2} mol/l). Die Arteriolen wurden nach Adaptation und KCl-Test für 40 min mit DAF-FM in einer Endkonzentration 2×10^{-5} mol/l in DMEM bei Raumtemperatur beladen. Der Perfusionsdruck wurde in dieser Phase auf 30 mmHg gesenkt, um die NO-Produktion niedrig zu halten. Danach wurde DAF-FM ausgewaschen.

Die Darstellung der Fluoreszenz erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzsystems von Visitron Systems (München, Deutschland). Dabei wurden die Gefäße mit Licht im Bereich von 490 nm Wellenlänge beleuchtet und damit DAF-FM-NO-Komplexe angeregt. Die Emission wurde im Bereich von 550-600 nm Wellenlänge gemessen. Belichtungslänge und andere Parameter der Darstellung wurden mit dem Programm VisiView (Visitron Systems, München, Deutschland) eingestellt. Ein entsprechendes Filtersystem, das in den Lichtweg

des Axiovert 100-Mikroskops eingebaut wurde, stammt von Chroma Technology (Bellows Falls, VT, USA). Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde mit dem Programm Metamorph (Molecular Devices, Silicon Valley, USA) durchgeführt. Mit Hilfe des Programmes wurden „regions of interest“ (ROIs) festgelegt, die in diesem Falle den Wänden der Arteriolen entsprachen. Die Intensitäten wurden farbkodiert.

Protokolle

Die DAF-FM-Fluoreszenz wurde in Arteriolen gemessen, die entweder 0,1% Albumin oder 4% Albumin in der DMEM Badlösung hatten. Außerdem wurde in einer weiteren Serie L-NAME (N(G)-Nitro-L-argininmethylester) in 0,1% Albumin-DMEM-Lösung appliziert. Hierdurch wurde die NO-Produktion gehemmt werden. Diese Serie diente der Abklärung der Spezifität der DAF-FM-Fluoreszenz. Die Vorbehandlungsdauer für 4% Albumin und L-NAME betrug 15 min. Eine entsprechende Zeitkontrolle erfolgte bei der 0,1%igen Albuminlösung. Die Fluoreszenz wurde dann jede Minute über 20 min erfasst und graphisch, gemittelt über alle Versuche, dargestellt.

Isometrische Untersuchungen an großen renalen Arterien der Maus und Ratte

Nach Sedierung mit Isofluran wurden die Mäuse bzw. Ratten dekapitiert und die Niere entnommen. Die Kapsel wurde entfernt und die Nieren in der Längsachse geschnitten. Die Präparation erfolgte in eisgekühlter Krebs-Henseleit-Lösung mit reduziertem Calcium-Anteil (146 mmol/l NaCl, 4,5 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l NaH_2PO_4 , 1,0 mmol/l MgSO_4 , 1,6 mmol/l CaCl_2 , 0,025 mol/l EDTA, 5,5 mmol/l Glukose, 5 mmol/l HEPES). Es wurden dann Arterien präpariert, die aus den Stammarterien entspringen und welche in die Aa. arcuatae übergehen (entspricht Aa. interlobares des Menschen). Diese wurden auf 2 mm Länge geschnitten und in einen Drahtmyographen eingespannt (Modell 410A, DMT, Dänemark, Abb. 4). Die Gefäße wurden etwa 30 min nach Tötung des Tieres mit Hilfe von 40 μm dicken rostfreiem Draht zwischen dem Kraftaufnehmer und dem beweglichen Befestigungsteil fixiert. Die Gefäße wurden langsam auf 37°C erwärmt. Dann wurde eine Gefäßgrundspannung bzw. Gefäßdurchmesser eingestellt. Die Einstellung orientierte sich an dem Verfahren von Mulvany (94). Der Durchmesser wurde auf 80% des Durchmessers gesetzt, der einem transmuralen Druck (Spannung) von 100 mmHg entsprach.

Protokolle

Die Experimente wurden unter Carbogen-Begasung folgender Lösung bei pH 7,4 und 36°C durchgeführt: 118,6 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl_2 , 1,2 mmol/l MgSO_4 , 1,2 mmol/l KH_2PO_4 , 25,1 mmol/l NaHCO_3 und 5,5 mmol/l Glukose.

Zunächst wurde eine KCl-haltige Lösung (100 mmol/l KCl) appliziert und eine stabile Kraftentwicklung abgewartet. Danach wurde für 10 min ausgewaschen. Im Anschluss wurde dann entweder eine kumulative Angiotensin II-Konzentrations-Wirkungskurve (10^{-10} – 10^{-6} mol/l) für 0,1% und 4% Albumin in der Lösung (Maus), oder eine Noradrenalin-Konzentrations-Wirkungskurve (Ratte) gemessen. Die dabei jeweils entstehenden Kräfte wurden auf die Kraft bei 100 mmol/l KCl-Stimulation bezogen.

Im Anschluss an die Konzentrations-Wirkungskurven für Angiotensin II, wurden nach mehrmaligem Auswaschen und Erreichen des Ausgangstonus Azetylcholin (ACh)-Konzentrationskurven gemessen. Die Gefäße wurden dazu mit Phenylephrin auf 50% der maximalen KCl-Kontraktion vorkontrahiert. ACh wurde in kumulativ appliziert (Endkonzentrationen im Bad: 10^{-9} - 10^{-6} mol/l).

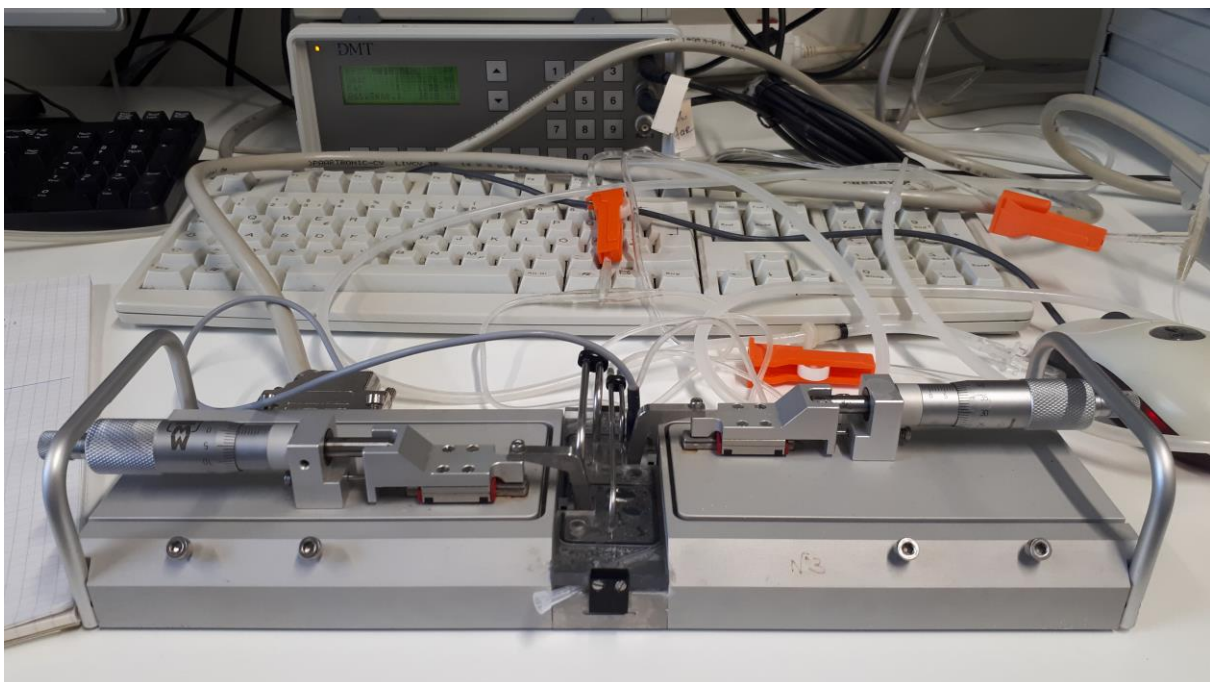


Abb. 4: Experimenteller Aufbau für die Messung der Kraft in großen Gefäßen. Im Vordergrund sieht man das Messgerät mit zwei Kammern (vorn und hinten, in der Mitte der Abbildung), die mit Carbogen begast werden. Auf beiden Seiten befinden sich Mikrometerschrauben für die Einstellung der Vorspannung. Im Hintergrund ist der Signal-Verstärker mit digitaler Anzeige dargestellt.

Expression von NOS-Isoformen in afferenten Arteriolen und in großen renalen Arterien und der Maus

Große renale Arterien: Männliche Mäuse (C57BL6), 25-30 g Körpermasse wurden, wie oben beschrieben, euthanasiert, die Nieren zügig entnommen, dekapsuliert, und in der Längsachse geschnitten. Die Präparation der großen Arterien erfolgte in einer gekühlten, themoregulierten DMEM-Lösung (0,1% Albumin) bei 4°C. Die Zeitdauer zum Sammeln der Gefäße eines Tieres betrug maximal 90 min. Die präparierten und behandelten Arterien

wurden in Eppendorfgefäßen (1 Gefäß pro Tier) in flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann bis zur Aufarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Afferente Arteriolen: Die Isolation der afferente Arteriolen (präglomeruläre Gefäße erfolgte mit der leicht modifizierten Eisenoxid/Magnet/Sieb-Methode von Chaudhari und Kirschenbaum (21). Nach Sedierung mit Isofluran wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Eröffnung des Bauraumes wurden die Aorta dargestellt und unterhalb des Nierenarterienabgangs abgeklemmt. Die Vena cava inferior wurde eröffnet. Der Thorax wurde eröffnet und die linke Herzkammer mit einer Kanüle punktiert. Darüber erfolgte die Spülung des Gefäßsystems mit PBS-Lösung und im Anschluss daran die Perfusion von Eisenoxidlösung (0,5 g Eisen(II,III)-oxid, 0,5 g BSA auf 50 ml PBS, ultraschallbehandelt). Der Erfolg der Perfusion wurde anhand einer einheitlichen Dunkelfärbung beider Nieren beurteilt.

Die Nieren wurden entnommen und die Kapsel entfernt. Die nachfolgende Behandlung erfolgte eisgekühlt. Zunächst wurde die Nierenrinde gewonnen und 4 min mit Hilfe einer Spezialklinge (Apollo-Klinge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gehackt. Nach Suspension in 15 ml PBS wurden das Nierengewebe durch siebenmaliges Pressen durch eine Kanüle weiter zerkleinert und die eisengefüllten Gefäße mittels starker Magneten von den anderen Partikeln der Suspension getrennt. Der Vorgang der Zerkleinerung und Trennung wiederholte sich unter Verwendung einer kleineren Kanüle. Die isolierten eisenhaltigen Partikel wurden in 5 ml PBS resuspendiert und dann durch ein Gewebe mit 80 µm Maschengröße (Verseidag-Techfab GmbH, Geldern-Walbeck) gepresst. Das auf dem Sieb verbliebene Gewebe wurde gewonnen und in 1 ml DMEM-Lösung in einem Eppendorfgefäß resuspendiert. Hier erfolgte die weitere Behandlung mit 0,1% oder 4% Albumin-DMEM-Lösung.

Protokoll

Gefäße von jeweils einem Tier wurden für 20 min entweder in einer DMEM-Lösung mit 4% oder 0,1% Albumin bei 37°C und Raumluft behandelt.

mRNA-Isolation und qPCR

Die RNA der isolierten großen renalen Arterien der Maus wurde unter Verwendung von "RNA-Bee RNA Isolation Reagent" (AMS Biotechnology Limited, Abingdon, UK) isoliert. Die Umschreibung in DNA erfolgte mit dem "High Capacity cDNA-Synthesis Kit" und Random-Hexamer-Nukleotiden (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) entsprechend des vom Hersteller empfohlenen Protokolls. Die quantitative PCR-Analyse wurde mit einem StepOnePlus-Apparat (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und unter Verwendung

von SYBR Green (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Dreifachansätze gemessen. Die Primer der interessierenden Gene sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Expression der Zielgene wurde auf das Referenz-Gen 18SrRNA bezogen (ΔCt -Methode). Die ΔCt eines Dreifachansatzes wurden gemittelt und dann auf den Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollen (0,1% Albumin) bezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Relative Genexpressionen wurden $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode als x-fache Expression dargestellt.

Tabelle 1.: Primersequenzen für die Analyse der Expression der drei NOS-Isoformen. Primer überspannen mindestens ein Intron (Eurofins, Ebersberg, Deutschland).

Gen	Nr.	Sequenz
eNOS	NM_008713	eNOS-fw: 5=-GTT TGT CTG CGG CGA TGT C-3= eNOS-rev: 5=-CAT GCC GCC CTC TGT TG-3=
iNOS	NM_070927	iNOS-fw 5=-GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG-3= iNOS-rev 5=-CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG-3=
nNOS	NM_008712	nNOS-fw 5=-TCG GCT GTG CTT TGA TGG A-3= nNOS-rev 5=-TTG AAT CGG ACC TTG TAG CTC TTC-3=

Statistik

Der Vergleich der Kurvenverläufe der Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Arteriolen wurde mit einem ANOVA-ähnlichen Test für wiederholte Messungen und bei fehlender Normalverteilung (Brunner-Test, R-Project, <https://www.r-project.org/>) durchgeführt. Dieser Test wurde der Berechnung der EC_{50} mit entsprechender statistischer Bewertung vorgezogen, da die Verläufe der Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Arteriolen oft keine ausreichend genaue Bestimmung der EC_{50} zulassen. Es wurde eine Signifikanz angenommen, wenn die p-Werte für Interaktion oder Lage der Kurve <0.05 waren. Die Nullhypothese für die Ausgangswerte der Arterioldurchmesser (Absolutwerte) wurde unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests (Sigmaplot, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) geprüft.

Die Sensitivität der Arterien der Maus und Ratte auf vasoaktive Substanzen wurde durch die Berechnung der EC_{50} der Substanzwirkung beurteilt. Die Bestimmung der EC_{50} erfolgte unter Verwendung des Programms Sigmaplot 12 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Für die statistische Bewertung möglicher Unterschiede in den EC_{50} -Werten zwischen den Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Auch hier wurden 5% als Irrtumswahrscheinlichkeit angenommen.

Ergebnisse

Einfluss extravasaler Proteinkonzentration auf die Reaktivität afferenter Arteriolen

Die afferenten Arteriolen der Maus wurden in DMEM-Badlösung mit einem Albuminanteil von 0,1% (n=20, Kontrolle) bzw. 4,0% (n=6, 4% Albumin) für 20 min perfundiert und die Durchmesser in zeitlichen Abständen von 5 min videomikroskopisch erfasst. Die Ausgangsdurchmesser der Gefäße vor Behandlung mit Protein betragen $8,8 \pm 0,12 \mu\text{m}$ (Kontrolle) bzw. $13,10 \pm 0,61 \mu\text{m}$ (4% Albumin, Vergleich $p < 0,001$) und nach Behandlung

9,3±0,16µm bzw. 13,11±0,57µm (Vergleich p<0,01). Die relativen Änderungen der Durchmesser waren im Vergleich beider Kurven gering unterschiedlich (Brunner Test: p<0,05). Der höhere Proteinanteil in der Badlösung ging mit etwas geringeren relativen luminalen Durchmessern ruhender Gefäße einher (Abb. 5).

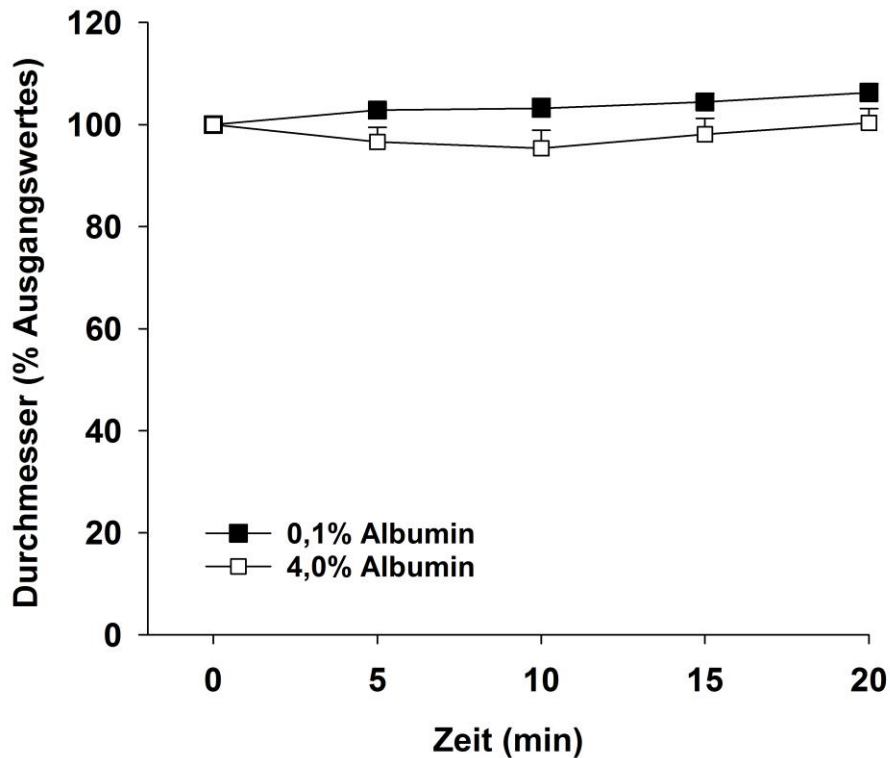


Abb. 5: Verlauf der Basaldurchmesser von afferenten Arteriolen in Badlösungen mit 0,1% oder 4,0% Albumin über eine Zeitspanne von 20min. * p<0.05, Brunner Test.

Im Anschluss an die Vorbehandlung wurde, in Anwesenheit von 0,1% oder 4,0% Albumin in der Badlösung, mit Angiotensin II in steigenden Konzentrationen behandelt. Die afferenten Arteriolen der Kontrollgruppe verengten sich infolge Angiotensin II-Gabe konzentrationsabhängig (0,1% n= 20, Abb. 6). Eine 4%ige Proteinkonzentration ging mit einer stärkeren Gefäßantwort im Bereich höherer Angiotensin II-Konzentrationen einher (4% n=6, p<0,05, Brunner Test, Abb. 6).

Effekt eines erhöhten osmotischen Druckes auf die Funktion afferenter Gefäße

Proteine tragen entsprechend ihrer Konzentration zum osmotischen Druck physiologischer Lösungen bei. Der Anteil der Proteine am osmotischen Druck wird kolloidosmotischer Druck genannt. Um auszuschließen, dass es sich vornehmlich um einen solchen physikochemischen Effekt der 4%igen Lösung bei der Verstärkung von Gefäßtonus- bzw. Gefäßreaktivität handelt, wurde eine Lösung mit dem gleichen kolloidosmotischen Druck, wie

4% Albumin erzeugt, hergestellt. Hierzu wurde der osmotische Druck der 0,1%igen und 4%igen Albuminlösung gemessen. Der osmotische Druck war um 3,5% höher in der 4% Albumin-Lösung im Vergleich zu 0,1%iger Albuminlösung. Der gleiche osmotische Druck der 4%igen Albumin-Lösung wurde eine 0,2% Mannitol-DMEM-Lösung erreicht. Unter Verwendung dieser Lösung wurden dann Angiotensin II-Konzentrations-Wirkungs-Kurven gemessen.

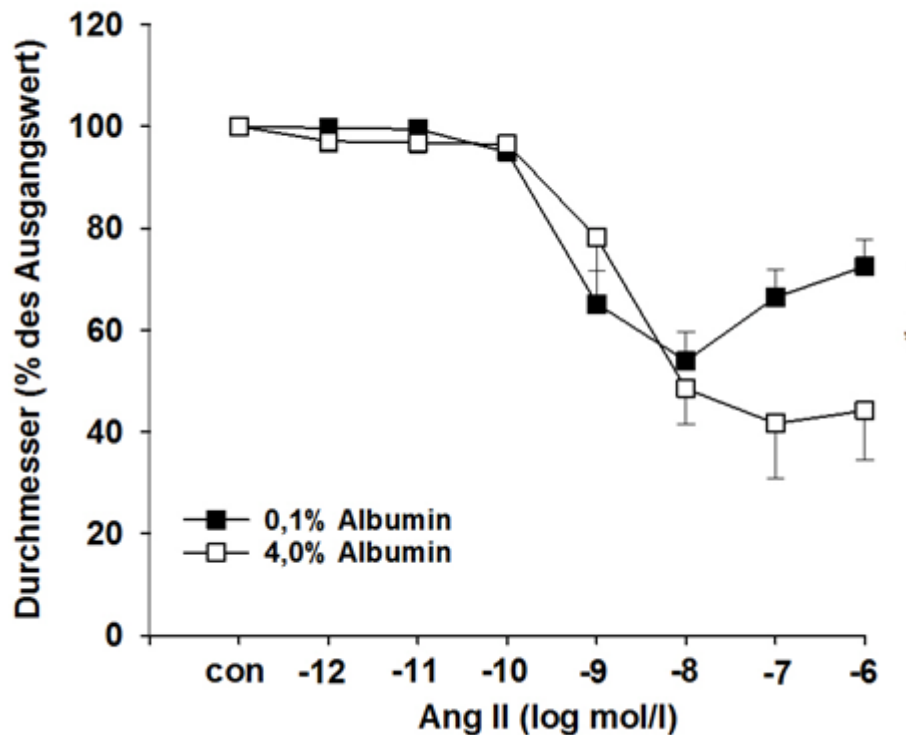


Abb. 6: Angiotensin II-Konzentrations-Wirkungskurven für 0,1% und 4% Albumin in der Badlösung (n=6, * p<0,05). con-Ausgangswert.

Die Ausgangsdurchmesser der Mannitolgruppe betrug $9.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ (n=5). Die Angiotensin II-Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Mannitol-Lösung unterschied sich nicht wesentlich von derjenigen, die unter Verwendung der 4%igen Albuminlösung erstellt wurde. Sie war aber signifikant verschieden von der Kurve der Kontrollgruppe mit 0,1% Albumin (p<0,05, Brunner Test, Abb. 7).

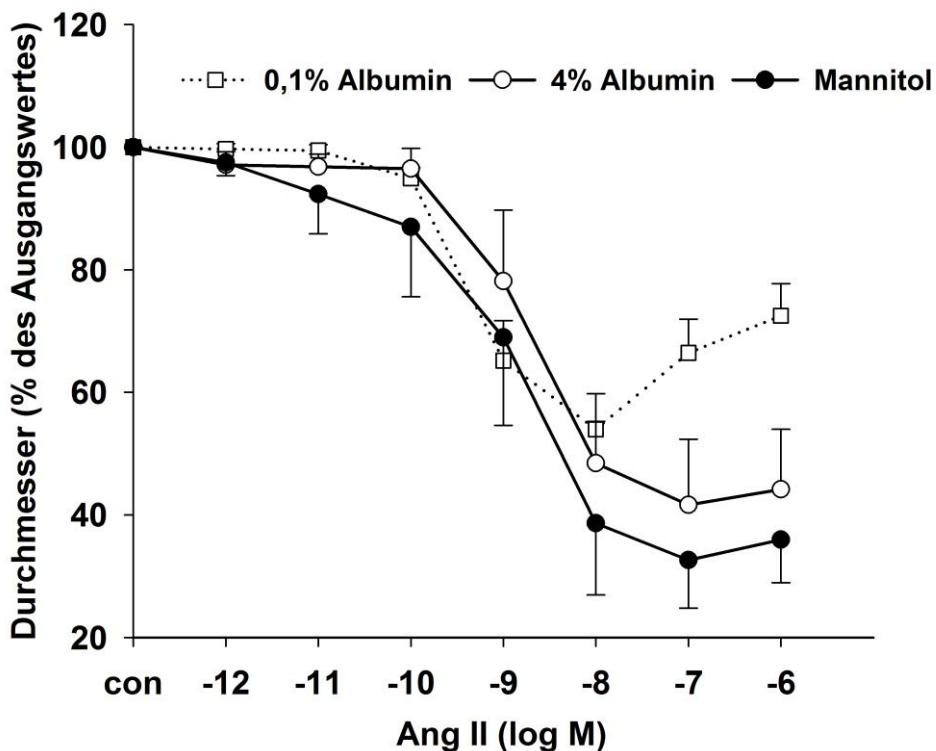


Abb. 7.: Angiotensin II-Konzentration-Wirkungskurven für 0,1%, 4,0% sowie einer mit Mannitol angereicherten Lösung (n=6), die den gleichen osmotischen Druck wie die 4%ige Albuminlösung hat. Con - Ausgangswert.

DAF-Fluoreszenz in afferenten Arteriolen mit niedriger und hoher Albuminkonzentration in der Badlösung

Proteine sind als NO-„scavenger“ bekannt. Wir haben deshalb mittels des Fluoreszenz-NO-Indikators DAF geprüft, inwieweit 4% Albumin in der Badlösung die Fluoreszenz und damit die NO-Verfügbarkeit beeinflusst. Die DAF-Fluoreszenz von Arteriolen mit 0,1% Albumin in der Badlösung zeigt einen stetig ansteigenden Verlauf über einen Beobachtungszeitraum von 20 min (n=7, Abb. 8 und Abb. 9). Dies lässt sich mit der weitest gehenden Irreversibilität der DAF-NO-Interaktion erklären. Die Steilheit der Kurve ist Ausdruck der NO-Verfügbarkeit. In 4%iger Badlösung gibt es praktisch keinen Anstieg der DAF-Fluoreszenz (n= 6, $p < 0.0001$). Der Verlauf über die Zeit entspricht etwa dem Effekt einer enzymatischen Blockade der NOS durch L-NAME (n=5, Abb. 9, $p < 0,002$ im Vergleich mit Kontrollgruppe).

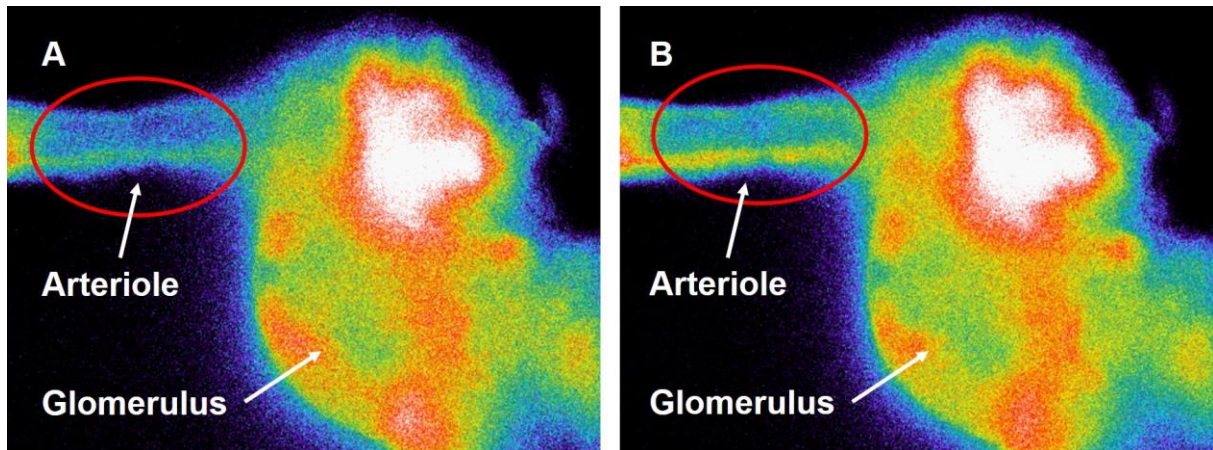


Abb. 8: Farbkodierte Darstellung einer afferenten Arteriole und zugehörigem Glomerulus auf der Basis der Intensität der DAF-Fluoreszenz (Farbskalierung von schwarz über blau, grün, gelb, rot bis weiß). A: Ausgangszustand nach ca. 45 min Beladung mit DAF-FM in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l in der Badlösung und nach Auswaschen des Farbstoffes. B: Fluoreszenz 5 min später: Die Intensität der DAF-Fluoreszenz in der Wand der Arteriole hat zugenommen, erkennbar am Farbwechsel von grün zu gelb.

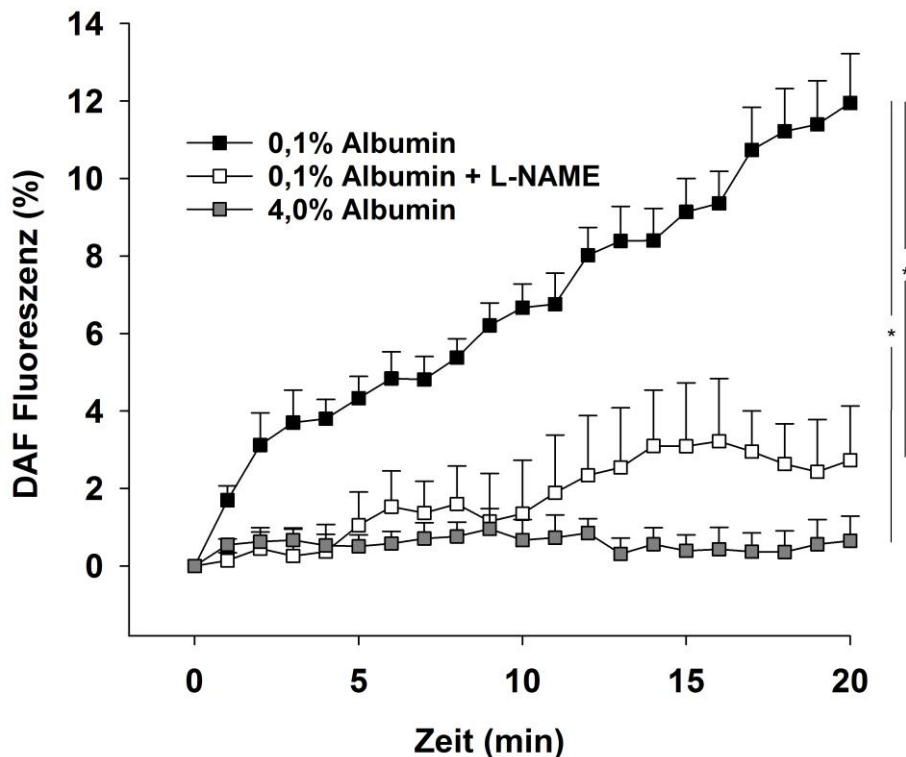


Abb. 9: Verlauf der DAF-Fluoreszenz über die Zeit für Arteriolen mit 0,1% oder 4% Albumin in der Badlösung sowie für L-NAME behandelte Gefäße. * $p < 0.05$ (Brunner Test).

Effekt von 4% Albumin in der Badlösung auf die Kontraktilität und Relaxation von großen Arterien der Mausniere

Es wurden große Arterien der Mausniere isometrisch im Drahtmyographen untersucht, um eine mögliche Selektivität der Albumineffekte für afferenten Arteriolen darzustellen. Die Gefäße wurden zunächst mit 0,1% Albumin (Kontrollgruppe) oder 4% Albumin für 15 min behandelt. Während dieser Zeit änderte sich die Kraft nicht signifikant: $1,34 \pm 0,37$ mN vs. $1,29 \pm 0,33$ mN (0,1% Albumin, n=5) sowie $1,10 \pm 0,28$ vs. $1,28 \pm 0,31$ mN (4% Albumin, n=7)). Angiotensin II wurde in kumulativen Konzentrationen von 10^{-10} mol/l bis 10^{-6} mol/l appliziert. Die Gefäße kontrahierten konzentrationsabhängig nur bis maximal 5% der KCl-Kontraktion. Die Kontraktionen im Vergleich einer 0,1%igen (n=5) mit einer 4% Albumin-Lösung (n=10) sind ähnlich. Die EC_{50} betragen $1,45 \cdot 10^{-7} \pm 5,00 \cdot 10^{-8}$ mol/l (0,1% Albumin) und $3,31 \cdot 10^{-7} \pm 2,37 \cdot 10^{-7}$ mol/l (4% Albumin), $P=0,426$, Abb. 11).

In diesen Gefäßen wurden auch Relaxationsuntersuchungen nach Vorkonstriktion mit Phenylephrin durchgeführt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterschieden sich im Vergleich von 0,1%iger und 4%iger Albuminlösung nicht (EC_{50} der 0,1%-Albuminlösung (n=5): $9,05 \cdot 10^{-7} \pm 4,00 \cdot 10^{-7}$ mol/l vs. EC_{50} der 4%-Albuminlösung (n=7): $3,07 \cdot 10^{-6} \pm 1,11 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $p=0,434$, Abb. 12 und 13).

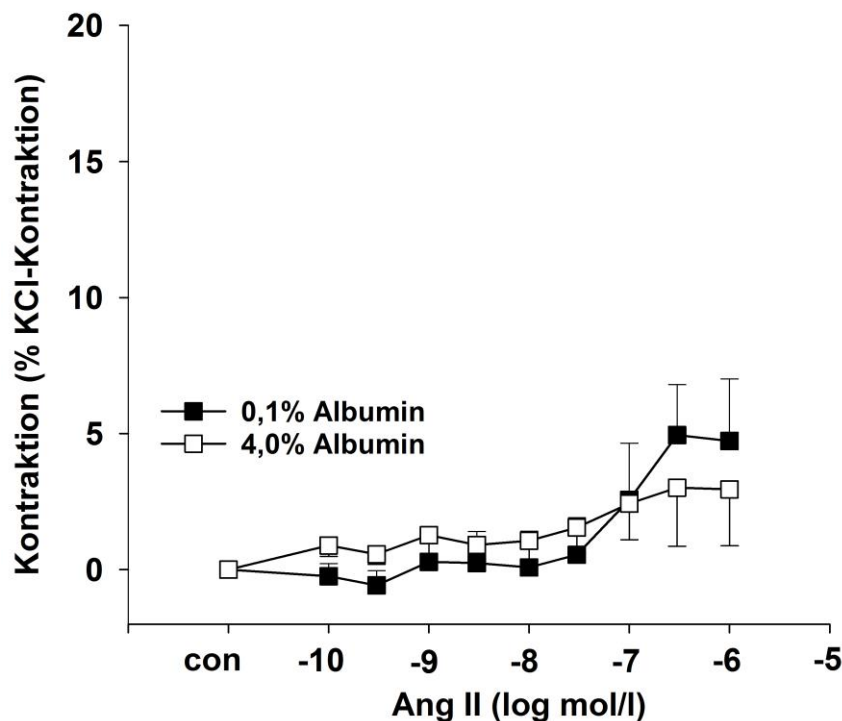


Abb. 10 : Effekt von 0,1%iger vs. 4%iger Albuminlösung auf die Reaktivität von großen renalen Arterien der Maus auf Angiotensin II. Die Kurvenverläufe unterscheiden sich nicht (Vergleich der EC_{50} -Werte mittels Mann-Whitney-Test). con-Ausgangswert.

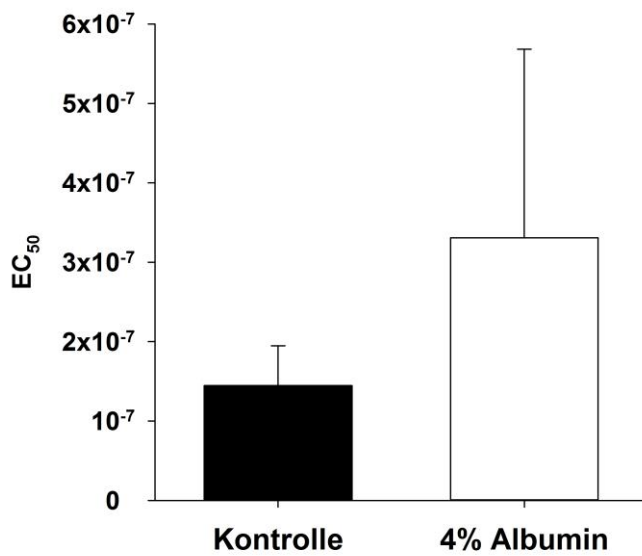


Abb. 11: Mittelwerte der EC₅₀ von großen Nierenarterien der Maus für Kontrollgruppe und 4% Albumin-Gruppe in Antwort auf Angiotensin II.

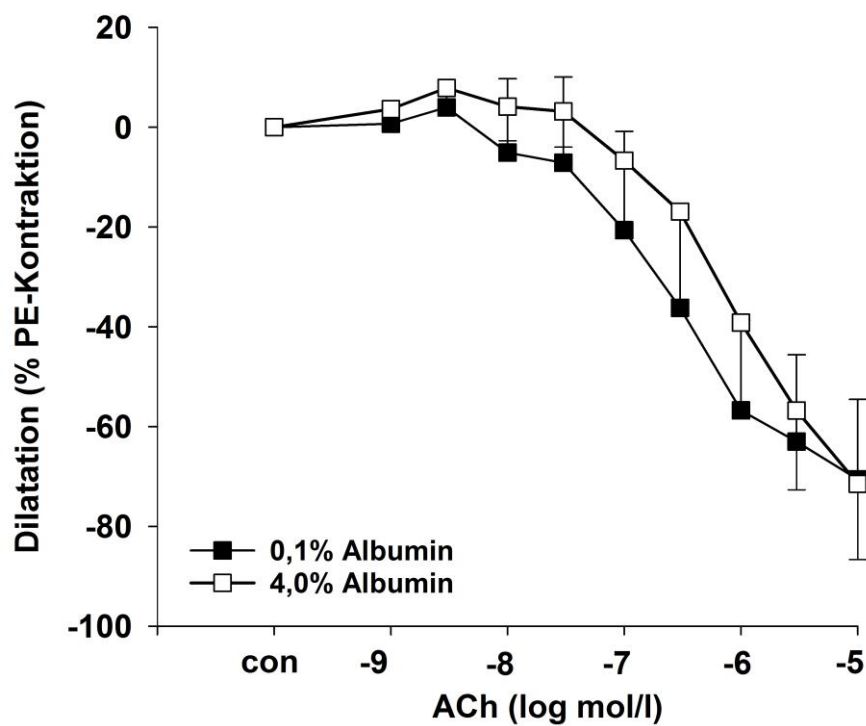


Abb. 12: Effekt von 0,1%iger und 4%iger Albuminlösung auf die Relaxation von großen renalen Arterien der Maus. Die Kurvenverläufe unterscheiden sich nicht (Vergleich der EC₅₀-Werte mittels Mann-Whitney-Test). con-Ausgangswert.

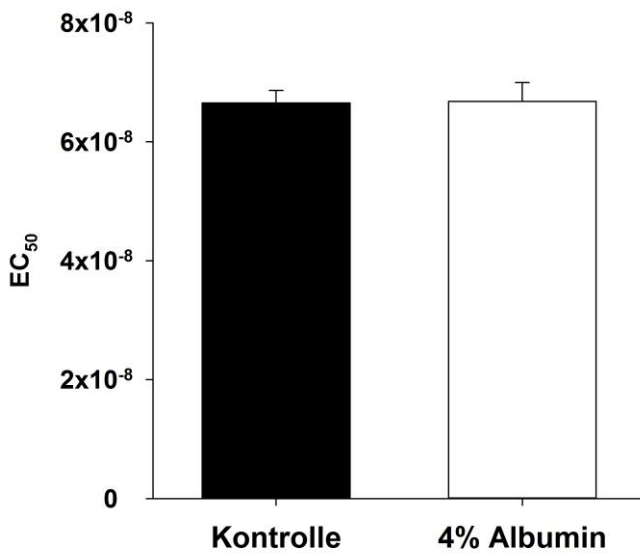


Abb. 13: Mittelwerte der EC_{50} von großen Nierenarterien der Maus für Kontrollgruppe und 4% Albumin-Gruppe in Antwort auf ACh.

Albumineffekt auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion großer renaler Arterien der Ratte

Um zu prüfen, ob die Spezies eine Rolle für die Beeinflussung bzw. Nichtbeeinflussung der Reaktivität renaler Arterien spielt, wurden große Nierenarterien der Ratte präpariert und im Drahtmyographen und isometrischen Bedingungen untersucht. Die Arterien zeigten nur sehr schwache Kontraktionen auf Angiotensin II, sodass Noradrenalin für die Auslösung der Kontraktion verwendet wurde. Die Applikation von Noradrenalin in kumulativen Konzentrationen bewirkte eine konzentrationsabhängige Kontraktion, die sich im Vergleich von albuminfreier Badlösung und 4%iger Albuminlösung nicht unterschied. Die EC_{50} betrug in der Kontrollgruppe (0,1%, n=16) $3,06 \cdot 10^{-6} \pm 1,36 \cdot 10^{-6}$ mol/l und in der Gruppe mit 4%iger Albuminlösung (n=16) $2,26 \cdot 10^{-6} \pm 2,13 \cdot 10^{-7}$ mol/l (P = 0,194, nicht signifikant, Abb. 14 und 15).

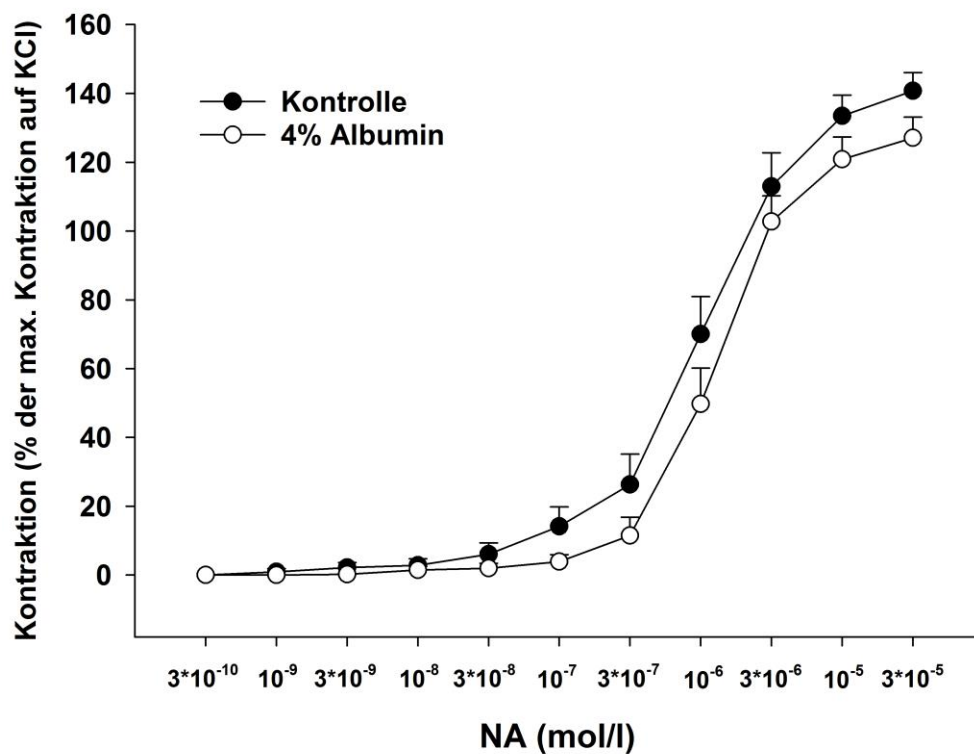


Abb. 14: Effekt einer 4%igen Albuminlösung auf die Noradrenalin (NA)-induzierte Kontraktion großer renaler Arterien der Ratte. Die beiden Kurven unterscheiden sich in ihrem Verlauf nicht signifikant (EC_{50} : Mann-Whitney-Test, nicht signifikant).

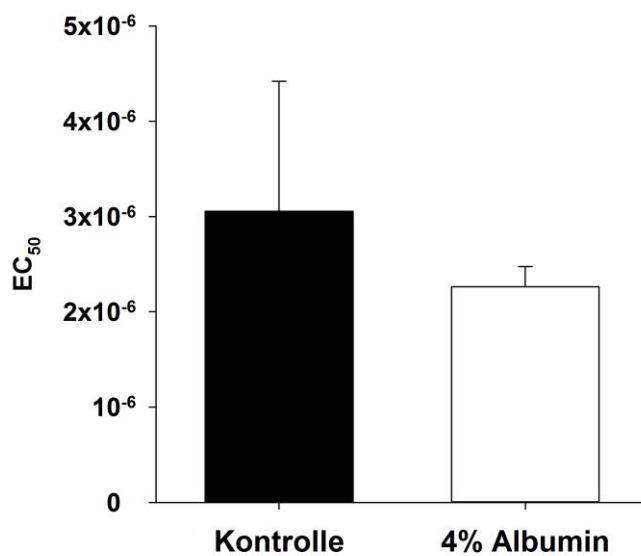


Abb. 15: Mittelwerte der EC_{50} von großen Nierenarterien der Ratte für Kontrollgruppe und 4% Albumin-Gruppe in Antwort auf Noradrenalin.

Expression von NOS-Isoformen in afferenten Arteriolen und großen Nierenarterien und der Maus

Mit dem Ziel, einen möglichen Einfluss erhöhter Proteinkonzentration auf die Expression von NOS-Isoformen zu detektieren, wurden afferente Arteriolen und große Nierenarterien und der Maus der Maus präpariert und mit 4%iger Albuminlösung für 20 min behandelt (n=60 Arterien aus 5 Mäusen, n=12 Mäuse für afferente Arteriolen). Afferente Arteriolen: Für keines der untersuchten Gene wurde ein Unterschied in der Expression im Vergleich von 4% und 0,1% Albumin gesehen. Die p-Werte (berechnet aus den delta CT-Werten) betragen eNOS: $p=0,937$, iNOS: $p=0,589$, nNOS: $p=0,699$ (Abb. 16). Große renale Arterien: Die mRNA-Expression für eNOS und nNOS ist im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit 0,1% Albumin (n=37 Arterien aus 5 Mäusen) in der Badlösung nicht signifikant verschieden (Mann-Whitney Test, eNOS: $p=0,151$, nNOS: $p=0,151$). Dagegen ist die mRNA-Expression für iNOS signifikant vermindert ($p=0,008$, Mann-Whitney-Test, Abb. 16).

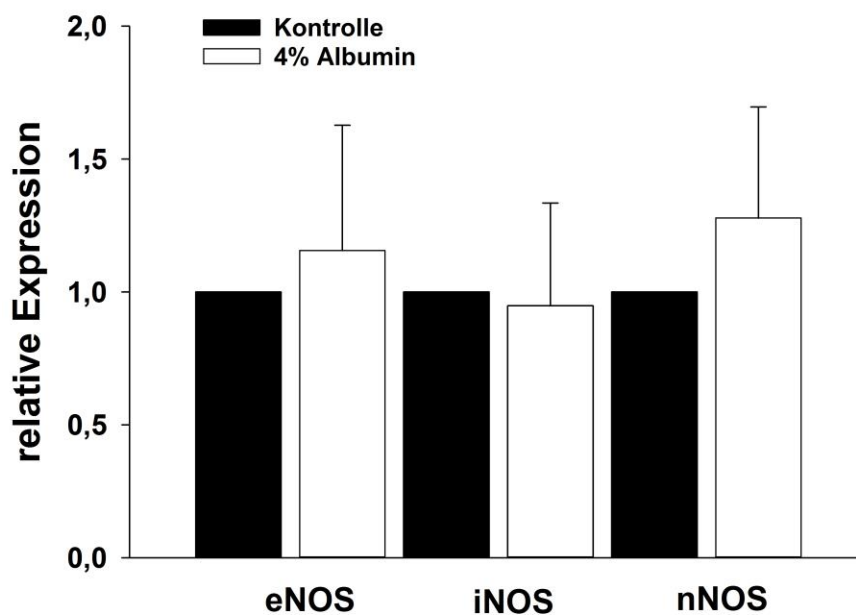


Abb. 16: Relative mRNA-Expression der NOS-Isoformen in afferenten Arteriolen der Mausniere.

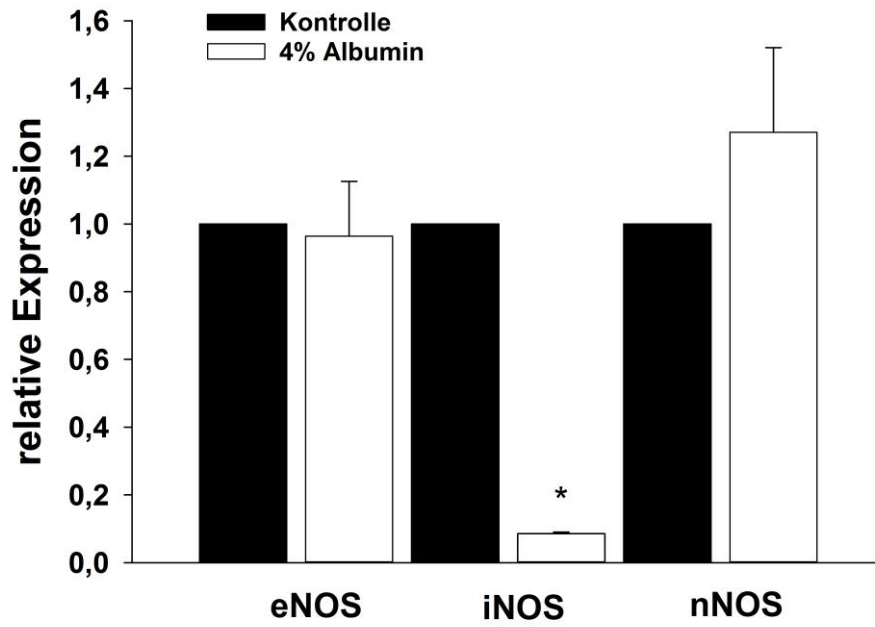


Abb.17: Relative mRNA-Expression der NOS-Isoformen in großen Nierenarterien der Mausniere. * p<0.05.

Diskussion

Methoden

Im Folgenden soll auf einige methodische Aspekte der Arbeit eingegangen werden, die für die Beurteilung der Ergebnisse von Relevanz sind.

Messung der Reaktivität isoliert perfundierter Arteriolen

Zur Prüfung der Haupthypothese wurden isolierte Arteriolen der Maus unter isotonischen Bedingungen untersucht (4; 118). Die Arteriolen wurden über eine in das Lumen vorgeschobene Pipette perfundiert und die Gefäßreaktivität mittels Änderungen des Gefäßdurchmessers beurteilt. Das Modell des isolierten und perfundierten Gefäßes hat den Vorteil, dass das extravasale Milieu sehr gut kontrolliert werden kann. Dies spielt für die Messaufgabe dieser Studie eine große Rolle. Die Perfusionsrate und der Perfusionsdruck können jedoch nur bedingt im individuellen Experiment kontrolliert werden. Sie hängen vom Widerstand der verwendeten Pipetten ab. Aus dem Grunde wurde großen Wert auf die genaue Herstellung der Perfusionspipetten (Außendurchmesser 5 μ m) gelegt. Die Macula densa-Zellen bzw. dicke aufsteigende Teil der Henle'schen Schleife werden in diesem Präparat nicht separat perfundiert und deshalb sind die Macula densa-Zellen einer nichtphysiologischen Konzentration von NaCl ausgesetzt.

Es wurden weltweit verschiedenste Methoden für die Untersuchung glomerulärer Arteriolen etabliert. Dazu zählt die juxtamedulläre Perfusion (106). Hierzu wird die Niere aufgeklappt und die medullanahen Anteile der Rinde videomikroskopisch dargestellt. Die Perfusion erfolgt über die Nierenarterie mit verdünntem Blut. Ein Nachteil besteht darin, dass die Untersuchung auf juxtamedulläre Arteriolen beschränkt ist, deren Regulation und Autoregulation sich von derjenigen der äußeren und midkortikalen Arteriolen unterscheidet. Des Weiteren kann hier das äußere Milieu nicht so leicht wie beim isolierten Gefäß manipuliert werden. Die isoliert perfundierte hydronephrotische Niere (56; 146) ist ebenfalls für die Untersuchung glomerulärer Gefäße geeignet. Die hydronephrotische Niere ist durch den Verlust von Tubuli und Erhalt von glomerulären Gefäßen charakterisiert. Die Gefäße werden videomikroskopisch dargestellt. Dabei wird die dünne Rindenschicht durchleuchtet oder auch mit Auflicht dargestellt. Ein Nachteil besteht in dem operativen Aufwand und Haltung der Tiere sowie Belastung der Tiere durch die Operation. Das äußere Milieu der Gefäße kann ebenfalls nicht genau kontrolliert werden. In jüngster Zeit wurde ein Modell des lebenden Nierenschnittes analog zum Hirnschnitt etabliert (110; 121). Nierenschnitte von 200 μ m Dicke werden akut mit Hilfe von Mikrotomen angefertigt und die Gefäße videomikroskopisch mittels differentiellm Interferenzkontrast oder konfokaler Mikroskopie

dargestellt. Die *in situ*-Situation mit umgebendem Nierengewebe eröffnet die Möglichkeit, Einflüsse von diesen Strukturen auf das Gefäßverhalten abzuschätzen. Die Schnitte und damit Gefäße sind nicht perfundiert und die Zellen werden durch Diffusion versorgt. Die im Zentrum des Schnittes zu erwartenden metabolischen Änderungen infolge Sauerstoffmangels können Einfluss auf die äußeren Schichten nehmen.

Im Ergebnis dieser Betrachtungen erscheint die von uns gewählte Methode adäquat zur Durchführung der aus der Hypothese abgeleiteten Aufgabenstellung.

Bestimmung der NO-Bioverfügbarkeit in Mikrogefäßen

Aufgrund von Beobachtungen über die Wirkungen von Albumin in renalen Mikrogefäßen unter Verwendung der juxtamedullären Perfusionstechnik, wurde angenommen, dass eine erhöhte extravasale Proteinkonzentration die NO-Bioverfügbarkeit verringert (125). Um diesen Effekt zu objektivieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine fluoreszenzbasierte Methode mit DAF-FM als Fluoreszenzfarbstoff angewendet. DAF-FM ist eine Weiterentwicklung des Fluoreszenzfarbstoffes DAF-2. Beide Substanzen haben die Eigenschaft, die Intensität der Fluoreszenzintensität, gemessen im Bereich von 550-600 nm, in Abhängigkeit von ihrer Interaktion mit NO zu verändern. Die Anregung erfolgte im Bereich von 490 nm. DAF-FM hat eine größere Photostabilität bei der Verbindung mit NO, eine geringere pH-Abhängigkeit bei pH<5.5 und eine höhere Sensitivität als DAF-2 (77). Bei kontinuierlichem NO-Durchsatz steigt die Fluoreszenz von DAF-FM durch Bildung von Triazolofluoreszeinen stetig an. Der Fluoreszenzintensitätsanstieg war bei Blockade des NOS deutlich geringer als unter Kontrollbedingungen. Das stimmt mit Beobachtungen früherer Studien überein (85), und weist auf eine spezifische Detektion von NO durch DAF-FM hin. NO wurde in biologischen Materialien auch mit Hilfe von NO-sensitiven Sonden (152), der Methode nach Griess (siehe (159)) oder der Chemilumineszenz (z.B. (98)) gemessen. Allerdings eignen sich diese Methoden aus technischen Gründen nicht für die Anwendung bei isoliert perfundierten Mikrogefäßen. NO-sensitive Elektroden sind zwar sehr empfindlich, können aber aufgrund ihrer Größe in Mikrogefäßen nicht eingesetzt werden. Die Griess-Reaktion wäre für die NO-Menge, die in Mikrogefäßen entsteht nicht sensitiv genug. Die Chemilumineszenz lässt sich ebenfalls nicht in perfundierten Gefäßen anwenden.

Messung der kontraktilen und dilatativen Funktion von großen Arterien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Drahtmyographie für die funktionelle Analyse der großen renalen Arterien verwendet. Hierbei werden Arterien unter isometrischen Bedingungen untersucht. Die Methode ist etabliert. Nach entsprechender Kalibrierung der Gefäße bestehen hinsichtlich der Vorspannung Verhältnisse, wie sie bei Arterien *in vivo* bei

100 mmHg Blutdruck etwa zu erwarten sind. Da es sich um offene Gefäßringe handelt, erreichen applizierte Wirkstoffe gleichermaßen Endothel und glatte Gefäßmuskelzellen. Die fehlende selektive Beeinflussung von Endothel und glatten Gefäßmuskelzellen ist ein Nachteil dieser Methode im Vergleich zu perfundierten oder unter Druck gesetzten Gefäßen. Auch die fehlende Perfusion und die damit zu erwartende geringere Aktivierung der NOS stellt eine Einschränkung der Methode dar. Für die Aufgabenstellung wäre eine Perfusion- oder Druckmyographie von Vorteil gewesen, stand jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie nicht zur Verfügung.

Wirkung von 4% Albumin in der Badlösung auf die Reaktivität von Gefäßen

Messungen der Ruhedurchmesser und der Gefäßreaktivität wurden an isoliert perfundierten Arteriolen mit 0,1% und 4% Albumin in der Badlösung durchgeführt. Ein erhöhte Albuminkonzentration ging mit etwas geringeren Durchmessern ($p < 0,05$) in nichtstimulierten Gefäßen (20 min-Periode) sowie verstärkter Angiotensin II-Antwort einher. Die Gefäßdurchmesseränderungen der Kontrollgruppe auf +105% des Ausgangsdurchmessers während 20-minütiger Kontrollsituation sind möglicherweise Ausdruck einer noch nicht abgeschlossenen Adaptation der Gefäße. Ein ähnliches Verhalten wurde auch in anderen Studien der Arbeitsgruppe unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen gesehen (85; 86). Die kleineren relativen Durchmesser (100%) der 4%-Albumingruppe nach 20 min Ruhe sind damit eher als relativer konstriktorischer Effekt zu interpretieren. Zusätzlich zu diesen Unterschieden wurden auch deutlich geringere luminale arterioläre Durchmesser nach Angiotensin II-Gabe in Anwesenheit von 4% Albumin gefunden. Dies betrifft Angiotensin II-Konzentrationen von 10^{-7} mol/l und 10^{-6} mol/l, die als verhältnismäßig hoch anzusehen sind. Unter Kontrollbedingungen ist der Verlauf der Angiotensin II-Konzentrations-Wirkungs-Kurve durch eine relative Erweiterung der Gefäße in diesem Konzentrationsbereich charakterisiert. Diese Beobachtung entspricht qualitativ den Befunden früherer Studien der Arbeitsgruppe (85; 86; 115). Die Ursache für diese Gefäßantwort ist nicht systematisch untersucht worden. Vielleicht kommt es zu verstärkter NO-Freisetzung via AT_1 -Rezeptorstimulation (117). Die stärkere Gefäßantwort im Bereich von 10^{-7} und 10^{-6} mol/l Angiotensin II bei 4% Albuminkonzentration der Badlösung könnte durch die NO-Protein-Interaktion hervorgerufen sein. Albumin wird in Anwesenheit von NO nitrosyliert und vermindert damit die NO-Bioverfügbarkeit. Die Bindung von NO an Albumine in Form von S-Nitrosothiolen stellt jedoch zugleich eine langlebige Form von biologisch aktivem NO dar. Es wird vermutet, dass ein Teil der dilatativen Eigenschaft von NO mit dieser chemischen Form zusammenhängt (39). Es stellt sich daher die Frage, welcher Wirkmechanismus zur verstärkten Vasokonstriktion bei 4% Albumingehalt in der Badlösung beiträgt.

Die erhöhte Albuminkonzentration führte zu einer Erhöhung des osmotischen Druckes. Es wurde deshalb getestet, wie eine mannitolhaltige Lösung mit gleichem osmotischen Druck wie die 4% Albumin-Lösung, die Gefäßreaktivität beeinflusst. Die Angiotensin II-Antwort unterschied sich nicht von derjenigen bei 4% Albumingehalt. Dies deutet darauf hin, dass die kolloidosmotischen Druckänderungen eine wichtige Rolle für die Wirkung von Albumin spielen. In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf die Effekte veränderten osmotischen Druckes auf die Gefäßfunktion. Im Umbilikalarterien des Menschen verursachten stark hypertone Lösungen (340-539 mosm/kg) eine biphasische Kontraktion, die Calcium-abhängig war (133). Osmotische Druckunterschiede zwischen Lumen und extravasalem Raum beeinflusste die KCl-induzierte Kontraktion von Hirnarterien des Kaninchens (156). Aortenringe von Meerschweinchen zeigten deutliche Kontraktionen bei Behandlung mit hypotonen Lösungen. Dies ging mit einer Aktivierung von Anionenkanälen einher (82). Osmotische Druckveränderungen durch Mannitolgabe in die Badlösung hatte dagegen keinen Einfluss auf die Noradrenalin- oder Depolarisations-induzierte Kontraktion in Mesenterialarterien der Ratte (104). Unsere Ergebnisse in renalen Arterien der Maus- und Rattenniere sprechen eher gegen einen Einfluss von Protein (Osmolarität) auf die Funktion großer Arterien. Die vorliegende Arbeit und eine weitere Studie (45) zeigen ja zudem, dass die erhöhte Albuminkonzentration in der Badlösung die Angiotensin II-Antwort renaler afferenter Arteriolen der Maus und Ratte, nicht aber Arteriolen anderer Gefäßgebiete oder großer Arterien verstärkt. Dies weist auf eine Nierenarteriolen-spezifische Eigenschaft hin.

Die Rolle von NO für die verstärkte Gefäßreaktivität

Hinweise auf mögliche Mechanismen des Albumineffekts geben die Untersuchungen zur NO-Bioverfügbarkeit in den afferenten Arteriolen. Die Fluoreszenz von DAF-FM war während 4% Albuminbehandlung im Verlauf von 20 min annähernd unverändert, während sie in Arteriolen mit 0,1% Albumin in der Badlösung kontinuierlich anstieg. Die DAF-FM-Fluoreszenz änderte sich auch unter NOS-Blockade mit L-NAME nur geringfügig. Diese Befunde unterstützen die Annahme einer geringeren NO-Bioverfügbarkeit in Gefäßen mit Albuminbehandlung. Eine mögliche NO-Albumin-Interaktion wurde schon erwähnt. Sie könnte zur Verminderung des verfügbaren NO beitragen. Da die Albuminwirkung an den renalen afferenten Arteriolen durch erhöhte Osmolalität der Badlösung mittels Mannitolgabe simuliert werden konnte, ist eine Beeinflussung über diesen Weg denkbar. Studien dazu sind rar. So modifizierte Dehydratation die Aktivität des kardialen NO-System (6) und führte zu verminderter NOS-Aktivität im kardiovaskulären System, inklusive der Aorta, in Ratten (103). Osmosensitive Änderungen der NO-Produktion wurden in der Leber von Welsen beobachtet (24). In Haarzellen des Innenohres induzierte Hypoosmolalität die NO-Produktion durch Calcium-Anstieg, der durch TRPV4-Kanäle vermittelt wurde (149). Im zentralen

Nervensystem wurde eine erhöhte Expression der nNOS infolge osmotischen Stresses gesehen (171). Diese, wenn auch sehr heterogenen, Arbeiten weisen auf eine Modulation der NOS-Expression und -Aktivität in Zellen durch osmotischen Stress hin. Im Gegensatz zu den oben genannten Befunden steht eine Untersuchung an Endothelzellen retinaler Mikrogefäße von Rindern. Kontrollendothelzellen, die mit Mannitol behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu Glukose-handelten Zellen keine verminderte eNOS-Expression auf (25). Unsere eigenen Befunde in großen Arterien der Mausniere zeigen eine signifikante Reduktion der iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung mit 4% Albumin-Lösung. Die eNOS- und nNOS-Expressionen blieben unverändert. iNOS trägt unter physiologischen Bedingungen vermutlich wenig zur NO-Bioverfügbarkeit im Nierengefäßsystem bei (29).. Deshalb ist eine weitere Verminderung der mRNA möglicherweise nicht von funktioneller Bedeutung. Große Arterien zeigten keine Verstärkung der Kontraktilität und auch keine Änderung der Relaxationsfähigkeit auf ACh im Vergleich von 4% und 0,1% Albumin. In afferenten Arteriolen waren eNOS, iNOS und nNOS im Vergleich von 0,1% und 4% Albumin auf mRNA-Ebene nicht unterschiedlich exprimiert. Trotzdem zeigten die Fluoreszenzuntersuchungen eine geringere NO-Bioverfügbarkeit. Es ist zu berücksichtigen, dass mRNA- oder auch Proteinexpressionen nur bedingt Auskunft über die wirkliche Aktivität der NOS und damit NO-Produktion geben. Behandlungsdauern mit Albumin in unserer Studie betragen 20 min. Dies ist ein relativ kurzer Zeitraum für transkriptionelle Änderungen der Expression. Posttranslationelle Regulationen der NOS könnten für den Albumineffekt aber durchaus eine Rolle spielen. Die NOS-Aktivität wird vielfältig moduliert. Calcium-aktiviertes Calmodulin ist ein starker Aktivator der eNOS und nNOS (13; 43; 127; 144). Caveolin-1 und Caveolin-3 unterdrücken dagegen die eNOS-Aktivität (42; 47; 71). Auch Phosphorylierung an Serin-, Tyrosin oder Threonin-Resten führt zu Aktivitätsänderungen der eNOS (27; 46). Es kann jedoch nur spekuliert werden, ob Albumin, eventuell via Änderung der Osmolalität, solche Wirkungen an den Gefäßen entwickelt. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Bedeutung, dass akute Änderung der Albuminkonzentration durch Lösungsaustausch schnell zu Änderungen der Gefäßreaktivität afferenter Arteriolen führt (45). Der Effekt des Albumins (0,1%, 2%, 4% in der Badlösung) war zudem vollständig reversibel. Hier müssen sehr schnelle Signalwege und Wirkmechanismen angenommen werden.

Die etablierte Methode der Mikroperfusion von glomerulären Gefäßen hat Besonderheiten, die für die Diskussion der Albuminwirkung von Bedeutung sein könnten. Die intravasale Perfusionslösung hat einen Albumingehalt von 1%. Die physiologische Konzentration von Plasmaproteinen beträgt 6-8%. Es gibt verschiedene Gründe für die Verwendung von 1% Albumin in der Perfusionslösung. Der Widerstand für die Perfusion durch die Schläuche und insbesondere der Spitze der inneren Perfusionspipette (Innendurchmesser <4µm) nimmt mit

zunehmender Proteinkonzentration zu. Ursache ist die höhere Viskosität der Lösung. Damit fällt der Druck überproportional über das Leitungssystem ab. Zum weiteren wurde beobachtet, dass der Durchmesser der Arteriolen sich deutlich mit steigender Albuminkonzentration in Perfusionslösung verringert (persönliche Kommunikation mit Prof. E.Y. Lai, Universität Hangzhou, China). Der Tonus steigt also. Dies könnte sowohl mit einem überproportionalen Druckabfall als auch mit Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit zu tun haben. Der Druck im Gefäß kann aufgrund der Kleinheit von Mausearteriolen nicht bestimmt werden. Verminderte NO-Fluoreszenz bei Albuminkonzentrationserhöhung von 4% auf 10% oder mehr wurde in juxtamedullären Präparationen der Niere gesehen (125). Dies kann auf verminderten Fluss infolge erhöhten Widerstands oder andere NO-vermindernde Mechanismen der Albumine beruhen. Die in unseren Experimenten verwendete, deutlich geringe intravasale, Proteinkonzentration im Vergleich zur physiologischen Situation, könnte mit der verstärkten Antwort des Gefäßes auf extravasale Konzentrationszunahme zusammenhängen. Diese Hypothese kann jedoch experimentell aufgrund der genannten Einschränkungen der Methode nicht getestet werden.

Selektivität des Albuminwirkung

Die Verstärkung der Angiotensin-II-Wirkung wurde nur in afferenten Arteriolen der Maus- und Rattenniere (45) gesehen. Albumin beeinflusste die Angiotensin II-Antwort von afferenten Arteriolen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas nicht signifikant (45). Auch die Angiotensin II-Antwort und die ACh-induzierte Dilatation großer Arterien (vergleichbar mit Aa. interlobares) der Maus wurde durch 4% Albumin nicht verändert (45). Gleiches trifft für die Noradrenalin-induzierte Kontraktion von großen Nierenarterien der Ratte der vorliegenden Arbeit zu. Diese Beobachtungen weisen der afferenten Arteriole der Niere eine besondere Rolle bei der Detektion von Protein- bzw. Osmolalitätsänderungen in der interstitiellen Flüssigkeit der Niere, und damit möglicherweise des Wasserbestandes im Körper, zu. Die Mechanismen dieser Wirkung konnten in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Ein erhöhter osmotischer Druck als auch verminderte NO-Bioverfügbarkeit spielen jedoch eine Rolle.

Hypothetische Funktion der Albuminwirkung an renalen afferenten Arteriolen für die Regulation des Wasserhaushalts

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Vermutung anderer Autoren, dass die Niere selbst signifikant zur Regulation des Volumenhaushalts beiträgt (107). Für eine Regulationsleistung durch die Niere allein muss dann ein intrarenaler „Rezeptor“, der Volumen- bzw. osmotische Änderungen erfasst, angenommen werden. Dieser Rezeptor, wie zum Beispiel die afferente Arteriole selbst, könnte die Albumin/Proteinkonzentration und/oder

die Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit detektieren. Die afferente Arteriole wäre zugleich der Effektor, via Änderung ihres Widerstandes, der zur Modulation der GFR und des renalen Blutflusses führen kann. Messungen der TGF in Tieren mit Dehydratation und Hyperhydratation unterstützen die Annahme einer solchen intrarenalen Regulation. Die TGF, untersucht mit Hilfe der Mikropunktionstechnik, war unter Dehydratation verstärkt und bei Volumenerhöhung abgeschwächt (140; 141). Dabei war renale interstitielle kolloidosmotische Druck in dehydrierten Tieren deutlich erhöht (141). Ein wesentlicher Mediator der TGF ist Adenosin, welches aus Macula densa-Zellen bei erhöhter NaCl-Belastung des distalen Tubulus freigesetzt wird. Es wird zudem durch extrazelluläre Enzyme aus ATP, welches ebenfalls in Antwort auf NaCl-Belastungen der Macula densa freigesetzt wird, gebildet (136; 137). Adenosin und Angiotensin II interagieren bei der Vermittlung der TGF an afferenten Arteriolen (123; 165). Es konnte nun gezeigt werden, dass 4% Albumin die biophasische Adenosinwirkung an renalen afferenten Arteriolen verstärkt (45). Zugleich wurde eine intensivere Adenosin–Angiotensin II-Interaktion an diesen Arteriolen bei erhöhter Albuminkonzentrationen in der Badlösung beobachtet (45). Diese Befundkonstellation lässt vermuten, dass die Modulation der TGF und damit der GFR durch extrazellulärer Proteinkonzentration in der Niere zur Regulation von Körpervolumen und Osmolalität beiträgt.

Zusammenfassung

Die Niere ist ein wichtiges Stellglied in der Regulation von Volumen und Osmolalität. Befunde aus Mikropunktionsuntersuchungen weisen auf eine Modulation der tubuloglomerulären Rückkopplung durch Volumengabe und Dehydratation hin. Die afferente Arteriole ist wesentlicher Bestandteil dieses Mechanismus. Änderungen im Wasserhaushalt gehen mit signifikanten Änderungen des Proteingehaltes der renalen interstitiellen Flüssigkeit einher und können die Funktion der afferenten Arteriole beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese geprüft, dass eine erhöhte extrazelluläre Proteinkonzentration den Tonus und Reaktivität renalen afferenter Arteriolen verstärkt. Dazu wurden afferente Arteriolen der Mausniere isoliert, perfundiert sowie videomikroskopisch fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ein Albumingehalt von 4% in der Badlösung (20 min Vorbehandlung) erhöht den Ruhetonus und verstärkt die Angiotensin II-Anwort afferenter Arteriolen der Maus im Vergleich zu einer 0,1%igen Albuminlösung. Höhere Albuminkonzentrationen in der Badlösung gingen mit höherem osmotischem Druck einher. Ein durch Mannitolgabe erhöhter osmotischer Druck verstärkt die Angiotensin II-Antwort afferenter Arteriolen ähnlich wie 4% Albumin. Fluoreszenzmikroskopische Messungen des Stickstoffmonoxids in den Arteriolen weisen auf eine sehr geringe Stickstoffmonoxidverfügbarkeit hin. Diese entspricht etwa derjenigen nach Blockade der

Stickstoffmonoxidsynthese. In großen Nierenarterien (Gefäßringe) wurde kein Effekt erhöhter Albuminkonzentration auf die Reaktivität der unter isometrischen Bedingungen getesteten Gefäße beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass afferente Arteriolen sensitiv auf Änderungen der extrazellulären Proteingehaltes reagieren. Dieses Phänomen steht wesentlich mit der Erhöhung des osmotischen Druckes der extrazellulären Lösung in Zusammenhang. Der Albumineffekt auf Gefäßtonus und –reaktivität wird möglicherweise durch eine drastisch erniedrigte Stickstoffmonoxidverfügbarkeit im Gefäß vermittelt. Die Studie unterstützt die Hypothese eines in der Niere lokalisierten Mechanismus der Detektion von Volumenänderungen und möglichen Beeinflussung der Nierenfiltration. Die afferente Arteriole könnte dabei als Sensor und Effektor fungieren.

Literaturverzeichnis

1. Adachi A, Nijijima A and Jacobs HL. An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. *Am J Physiol* 231: 1043-1049, 1976.
2. Alberola AM, Salazar FJ, Nakamura T and Granger JP. Interaction between angiotensin II and nitric oxide in control of renal hemodynamics in conscious dogs. *Am J Physiol* 267: R1472-R1478, 1994.
3. Andersen LJ, Jensen TU, Bestle MH and Bie P. Gastrointestinal osmoreceptors and renal sodium excretion in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R287-R294, 2000.
4. Arima S and Ito S. Isolated juxtaglomerular apparatus as a tool for exploring glomerular hemodynamics: application of microperfusion techniques. *Exp Nephrol* 8: 304-311, 2000.
5. Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, Satoh F, Takeuchi K and Ito S. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 14: 2255-2263, 2003.
6. Arza P, Netti V, Perosi F, Cernadas G, Ochoa F, Magnani N, Evelson P, Zotta E, Fellet A and Balaszczuk AM. Involvement of nitric oxide and caveolins in the age-associated functional and structural changes in a heart under osmotic stress. *Biomed Pharmacother* 69: 380-387, 2015.
7. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73: 599-601, 1984.
8. Bachmann S and Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis* 24: 112-129, 1994.
9. Baertschi AJ and Vallet PG. Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. *J Physiol* 315: 217-230, 1981.
10. Boudville N. The predictable effect that renal failure has on H2 receptor antagonists--increasing the half-life along with increasing prescribing errors. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2315-2317, 2005.
11. Bourque CW. Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurones by hyperosmotic stimuli. *J Physiol* 417: 263-277, 1989.
12. Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9: 519-531, 2008.
13. Bredt DS and Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 682-685, 1990.

14. Brochu E, Lacasse S, Lariviere R, Kingma I, Grose JH and Lebel M. Differential effects of endothelin-1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 10: 1440-1446, 1999.
15. Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B and Persson AE. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A(1) receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1362-R1367, 2001.
16. Brown R, Ollerstam A and Persson AE. Neuronal nitric oxide synthase inhibition sensitizes the tubuloglomerular feedback mechanism after volume expansion. *Kidney Int* 65: 1349-1356, 2004.
17. Carlstrom M, Lai EY, Ma Z, Patzak A, Brown RD and Persson AE. Role of NOX2 in the regulation of afferent arteriole responsiveness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R72-R79, 2009.
18. Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J and Schnermann J. Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 114: 634-642, 2004.
19. Cavarape A, Bauer J, Bartoli E, Endlich K and Parekh N. Effects of angiotensin II, arginine vasopressin and thromboxane A2 in renal vascular bed: role of rho-kinase. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1764-1769, 2003.
20. Cernaro V, Trifiro G, Lorenzano G, Lucisano S, Buemi M and Santoro D. New therapeutic strategies under development to halt the progression of renal failure. *Expert Opin Investig Drugs* 23: 693-709, 2014.
21. Chaudhari A and Kirschenbaum MA. A rapid method for isolating rabbit renal microvessels. *Am J Physiol* 254: F291-F296, 1988.
22. Chen J and Fleming JT. Juxtamedullary afferent and efferent arterioles constrict to renal nerve stimulation. *Kidney Int* 44: 684-691, 1993.
23. Choi-Kwon S and Baertschi AJ. Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways. *Am J Physiol* 261: E18-E25, 1991.
24. Choudhury MG and Saha N. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by Lipopolysaccharide and the Influences of Cell Volume Changes, Stress Hormones and Oxidative Stress on Nitric Oxide Efflux from the Perfused Liver of Air-Breathing Catfish, *Heteropneustes fossilis*. *PLoS One* 11: e0150469, 2016.
25. Connell P, Walshe T, Ferguson G, Gao W, O'Brien C and Cahill PA. Elevated glucose attenuates agonist- and flow-stimulated endothelial nitric oxide synthase activity in microvascular retinal endothelial cells. *Endothelium* 14: 17-24, 2007.

26. Correia AG, Denton KM and Evans RG. Effects of activation of vasopressin-V1-receptors on regional kidney blood flow and glomerular arteriole diameters. *J Hypertens* 19: 649-657, 2001.
27. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC and Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991, 1996.
28. Cowley AW, Jr., Mori T, Mattson D and Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1355-R1369, 2003.
29. Dautzenberg M, Keilhoff G and Just A. Modulation of the myogenic response in renal blood flow autoregulation by NO depends on endothelial nitric oxide synthase (eNOS), but not neuronal or inducible NOS. *J Physiol* 589: 4731-4744, 2011.
30. Davalos M, Frega NS, Saker B and Leaf A. Effect of exogenous and endogenous angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 235: F605-F610, 1978.
31. Denton KM, Anderson WP and Sinniah R. Effects of angiotensin II on regional afferent and efferent arteriole dimensions and the glomerular pole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R629-R638, 2000.
32. DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1517-R1524, 2000.
33. Doggrell SA. The role of 5-HT on the cardiovascular and renal systems and the clinical potential of 5-HT modulation. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 805-823, 2003.
34. Dumont Y, D'Amours M, Lebel M and Lariviere R. Supplementation with a low dose of L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant* 16: 746-754, 2001.
35. Dworakowski R, Alom-Ruiz SP and Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 60: 21-28, 2008.
36. Edwards RM and Trizna W. Modulation of glomerular arteriolar tone by nitric oxide synthase inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 4: 1127-1132, 1993.
37. Endlich K, Kuhn R and Steinhausen M. Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats. *Kidney Int* 43: 314-323, 1993.
38. Fallet RW, Ikenaga H, Bast JP and Carmines PK. Relative contributions of Ca²⁺ mobilization and influx in renal arteriolar contractile responses to arginine vasopressin. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F545-F551, 2005.

39. Farkas J and Menzel EJ. Proteins lose their nitric oxide stabilizing function after advanced glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1245: 305-310, 1995.
40. Fellner SK and Arendshorst W. Endothelin-A and -B receptors, superoxide, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F175-F184, 2007.
41. Fellner SK and Arendshorst WJ. Endothelin A and B receptors of preglomerular vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 65: 1810-1817, 2004.
42. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 22810-22814, 1996.
43. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M and Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42: 1849-1857, 1991.
44. Fu Y, Hall JE, Lu D, Lin L, Manning RD, Jr., Cheng L, Gomez-Sanchez CE, Juncos LA and Liu R. Aldosterone blunts tubuloglomerular feedback by activating macula densa mineralocorticoid receptors. *Hypertension* 59: 599-606, 2012.
45. Gao X, Liu ZZ, Mohammed H, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlstrom M, Patzak A and Persson AEG. Extravasal albumin concentration modulates contractile responses of renal afferent arterioles. *Acta Physiol (Oxf)*: 222(2), 2017, doi: 10.1111/apha.12925.
46. Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J and Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271: 27237-27240, 1996.
47. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE and Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6448-6453, 1996.
48. Geelen G, Greenleaf JE and Keil LC. Drinking-induced plasma vasopressin and norepinephrine changes in dehydrated humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2131-2135, 1996.
49. Geelen G, Keil LC, Kravik SE, Wade CE, Thrasher TN, Barnes PR, Pyka G, Nesvig C and Greenleaf JE. Inhibition of plasma vasopressin after drinking in dehydrated humans. *Am J Physiol* 247: R968-R971, 1984.
50. Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ and Webb DJ. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 109: 1186-1193, 2004.

51. Godecke A and Schrader J. Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice--lessons from eNOS and myoglobin knockout mice. *Basic Res Cardiol* 95: 492-498, 2000.
52. Grenz A, Zhang H, Eckle T, Mittelbronn M, Wehrmann M, Kohle C, Kloor D, Thompson LF, Osswald H and Eltzschig HK. Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J Am Soc Nephrol* 18: 833-845, 2007.
53. Guan Z, Fellner RC, Van BJ and Inscho EW. P2 receptors in renal autoregulation. *Curr Vasc Pharmacol* 12: 818-828, 2014.
54. Harrison IP and Selemidis S. Understanding the biology of reactive oxygen species and their link to cancer: NADPH oxidases as novel pharmacological targets. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41: 533-542, 2014.
55. Harrison-Bernard LM and Carmines PK. Juxtamedullary microvascular responses to arginine vasopressin in rat kidney. *Am J Physiol* 267: F249-F256, 1994.
56. Hayashi K, Epstein M and Loutzenhiser R. Pressure-induced vasoconstriction of renal microvessels in normotensive and hypertensive rats. Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 65: 1475-1484, 1989.
57. Heller J. Effect of vasoactive mediators on renal haemodynamics. *Nephrol Dial Transplant* 2: 197-204, 1987.
58. HENRY JP, GAUER OH and REEVES JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 4: 85-90, 1956.
59. Hocherl K, Kammerl MC, Schumacher K, Endemann D, Grobecker HF and Kurtz A. Role of prostanoids in regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F294-F301, 2002.
60. Huang DY, Vallon V, Zimmermann H, Koszalka P, Schrader J and Osswald H. Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and -independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F282-F288, 2006.
61. Hultstrom M, Lai EY, Ma Z, Kallskog O, Patzak A and Persson AE. Adenosine triphosphate increases the reactivity of the afferent arteriole to low concentrations of norepinephrine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2225-R2231, 2007.
62. Ichihara A, Imig JD, Inscho EW and Navar LG. Cyclooxygenase-2 participates in tubular flow-dependent afferent arteriolar tone: interaction with neuronal NOS. *Am J Physiol* 275: F605-F612, 1998.
63. Ichikawa I and Harris RC. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 40: 583-596, 1991.

64. Imig JD, Cook AK and Inscho EW. Postglomerular vasoconstriction to angiotensin II and norepinephrine depends on intracellular calcium release. *Gen Pharmacol* 34: 409-415, 2000.
65. Imig JD, Falck JR, Wei S and Capdevila JH. Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilation in response to bradykinin. *J Vasc Res* 38: 247-255, 2001.
66. Inscho EW, Imig JD, Cook AK and Pollock DM. ETA and ETB receptors differentially modulate afferent and efferent arteriolar responses to endothelin. *Br J Pharmacol* 146: 1019-1026, 2005.
67. Ito S, Arima S, Ren YL, Juncos LA and Carretero OA. Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole. *J Clin Invest* 91: 2012-2019, 1993.
68. Ito S and Ren Y. Evidence for the role of nitric oxide in macula densa control of glomerular hemodynamics. *J Clin Invest* 92: 1093-1098, 1993.
69. Izawa S, Inoue K, Adachi A and Funahashi M. Activity of neurons in the nucleus of the solitary tract of rats: effect of osmotic and mechanical stimuli. *Neurosci Lett* 288: 33-36, 2000.
70. Johnson MD and Malvin RL. Stimulation of renal sodium reabsorption by angiotensin II. *Am J Physiol* 232: F298-F306, 1977.
71. Ju H, Zou R, Venema VJ and Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272: 18522-18525, 1997.
72. Just A, Whitten CL and Arendshorst WJ. Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA and ETB receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F719-F728, 2008.
73. Kaufmann J, Martinka P, Moede O, Sendeski M, Steege A, Fahling M, Hultstrom M, Gaestel M, Moraes-Silva IC, Nikitina T, Liu ZZ, Zavaritskaya O and 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, 2015.
74. Keil J, Lehnfeld R, Reinhardt HW, Mohnhaupt R and Kaczmarczyk G. Acute effects of angiotensin II on renal haemodynamics and excretion in conscious dogs. *Ren Physiol Biochem* 12: 238-249, 1989.
75. Kishore BK, Isaac J, Fausther M, Tripp SR, Shi H, Gill PS, Braun N, Zimmermann H, Sevigny J and Robson SC. Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney:

- relevance to regulation of P2 receptor signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1032-F1043, 2005.
76. Kloor D, Delabar U, Muhlbauer B, Luippold G and Osswald H. Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine. *Biochem Pharmacol* 63: 809-815, 2002.
 77. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y and Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl* 38: 3209-3212, 1999.
 78. Kuramochi G and Kobayashi I. Regulation of the urine concentration mechanism by the oropharyngeal afferent pathway in man. *Am J Nephrol* 20: 42-47, 2000.
 79. Kurtz L, Schweda F, de WC, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A and Wagner C. Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol* 18: 1103-1111, 2007.
 80. Lai EY, Patzak A, Steege A, Mrowka R, Brown R, Spielmann N, Persson PB, Fredholm BB and Persson AE. Contribution of adenosine receptors in the control of arteriolar tone and adenosine-angiotensin II interaction. *Kidney Int* 70: 690-698, 2006.
 81. Laight DW, Woodward B and Waterfall JF. Renal vasodilation to histamine in vitro: roles of nitric oxide, cyclo-oxygenase products and H2 receptors. *Inflamm Res* 44: 116-120, 1995.
 82. Lang F, Busch GL, Zempel G, Ditlevsen J, Hoch M, Emerich U, Axel D, Fingerle J, Meierkord S, Apfel H and . Ca²⁺ entry and vasoconstriction during osmotic swelling of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 431: 253-258, 1995.
 83. Lariviere R and Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 607-621, 2003.
 84. Liu R, Garvin JL, Ren Y, Pagano PJ and Carretero OA. Depolarization of the macula densa induces superoxide production via NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1867-F1872, 2007.
 85. Liu ZZ, Mathia S, Pahlitzsch TM, Wennysia IC, Persson PB, Lai EY, Hogner A, Xu MZ, Schubert R, Rosenberger C and Patzak A. Myoglobin facilitates angiotensin II induced constriction of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* ajprenal, 2017.
 86. Liu ZZ, Viegas VU, Perlewitz A, Lai EY, Persson PB, Patzak A and Sendeski MM. Iodinated contrast media differentially affect afferent and efferent arteriolar tone and reactivity in mice: a possible explanation for reduced glomerular filtration rate. *Radiology* 265: 762-771, 2012.

87. Lu Y, Zhang R, Ge Y, Carlstrom M, Wang S, Fu Y, Cheng L, Wei J, Roman RJ, Wang L, Gao X and Liu R. Identification and function of adenosine A3 receptor in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F1020-F1025, 2015.
88. Luff SE, Hengstberger SG, McLachlan EM and Anderson WP. Distribution of sympathetic neuroeffector junctions in the juxtaglomerular region of the rabbit kidney. *J Auton Nerv Syst* 40: 239-253, 1992.
89. Mason WT. Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature* 287: 154-157, 1980.
90. Matavelli LC and Siragy HM. AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 65: 226-232, 2015.
91. May CN, Calzavacca P, Ishikawa K, Langenberg C, Wan L, Ramchandra R and Bellomo R. Novel targets for sepsis-induced kidney injury: the glomerular arterioles and the sympathetic nervous system. *Exp Physiol* 97: 1168-1177, 2012.
92. Moran A, Ortiz de Urbina AV, Martin ML, Garcia M, Rodriguez-Barbero A, Dorado F and San RL. Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur J Pharmacol* 592: 133-137, 2008.
93. Muller-Suur R, Persson AE and Ulfendahl HR. Tubuloglomerular feedback in juxtamedullary nephrons. *Kidney Int Suppl* 12: S104-S108, 1982.
94. Mulvany MJ and Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19-26, 1977.
95. Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B and Kriz W. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42: 1017-1019, 1992.
96. Mutoh J, Ohsawa M and Hisa H. Involvement of renal sympathetic nerve activation on the progression of ischemic acute kidney injury in the mouse. *J Pharmacol Sci* 125: 415-421, 2014.
97. Myers BD, Deen WM and Brenner BM. Effects of norepinephrine and angiotensin II on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat. *Circ Res* 37: 101-110, 1975.
98. Nagababu E and Rifkind JM. Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species. *Free Radic Biol Med* 42: 1146-1154, 2007.
99. Nagasu H, Satoh M, Kidokoro K, Nishi Y, Channon KM, Sasaki T and Kashihara N. Endothelial dysfunction promotes the transition from compensatory renal hypertrophy

- to kidney injury after unilateral nephrectomy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1402-F1408, 2012.
100. Nakashima T, Hori T, Kiyohara T and Shibata M. Osmosensitivity of preoptic thermosensitive neurons in hypothalamic slices in vitro. *Pflugers Arch* 405: 112-117, 1985.
 101. Navar LG. Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics. *Am J Physiol* 274: F433-44, 1998.
 102. Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM and Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 76: 425-536, 1996.
 103. Netti VA, Iovane AN, Vatrella MC, Magnani ND, Evelson PA, Zotta E, Fellet AL and Balaszczuk AM. Dehydration affects cardiovascular nitric oxide synthases and caveolins in growing rats. *Eur J Nutr* 55: 33-43, 2016.
 104. Nielsen H, Bonnema SJ and Flyvbjerg A. Effects of diabetes, insulin treatment, and osmolality on contractility of isolated rat resistance arteries. *Pharmacol Toxicol* 77: 209-215, 1995.
 105. Nilius B, Owsianik G, Voets T and Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87: 165-217, 2007.
 106. Ohishi K, Carmines PK, Inscho EW and Navar LG. EDRF-angiotensin II interactions in rat juxtamedullary afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 263: F900-6, 1992.
 107. Osgood RW, Patton M, Hanley MJ, Venkatachalam M, Reineck HJ and Stein JH. In vitro perfusion of the isolated dog glomerulus. *Am J Physiol* 244: F349-F354, 1983.
 108. Osswald H, Nabakowski G and Hermes H. Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int J Biochem* 12: 263-267, 1980.
 109. Ozawa Y, Hayashi K, Nagahama T, Fujiwara K, Wakino S and Saruta T. Renal afferent and efferent arteriolar dilation by nilvadipine: studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 243-247, 1999.
 110. Pahlitzsch TM, Liu ZZ, Al-Masri A, Braun D, Dietze S, Persson PB, Schunck WH, Blum M, Kupsch E, Ludwig M and Patzak A. Hypoxia/reoxygenation enhances murine afferent arteriolar vasoconstriction by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* ajrenal, 2017.
 111. Palmgren E, Widgren B, Aurell M and Herlitz H. Increased renal vascular sensitivity to angiotensin II in hypertension is due to decreased response to prostaglandins. *J Hypertens* 21: 969-976, 2003.

112. Pape H.-C., Kurtz A and Silbernagl S. *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014.
113. Patel S, Rauf A, Khan H and Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother* 94: 317-325, 2017.
114. Patzak A, Carlstrom M, Sendeski MM, Lai EY, Liu ZZ, Sallstrom J, Floge J, Heintz B, Jankowski J and Jankowski V. Diadenosine pentaphosphate modulates glomerular arteriolar tone and glomerular filtration rate. *Acta Physiol (Oxf)* 213: 285-293, 2015.
115. Patzak A, Kleinmann F, Mrowka R, Kupsch E, Skalweit A and Persson PB. Lack of endothelial and neuronal isoform of nitric oxide synthase affects angiotensin II sensitivity in afferent arterioles of mice. *Eur J Physiol (Pflügers Arch , Suppl)* 445: 50, 2003.
116. Patzak A, Lai E, Persson PB and Persson AE. Angiotensin II-nitric oxide interaction in glomerular arterioles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 410-414, 2005.
117. Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson P.B. and Persson A.E.G. AT1 receptors mediate angiotensin II induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int* 66: 1949-1958, 2004.
118. Patzak A, Mrowka R, Storch E, Hocher B and Persson PB. Interaction of angiotensin II and nitric oxide in isolated perfused afferent arterioles of mice. *J Am Soc Nephrol* 12: 1122-1127, 2001.
119. Patzak A and Persson AE. Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16: 46-51, 2007.
120. Patzak A, Steege A, Lai EY, Brinkmann JO, Kupsch E, Spielmann N, Gericke A, Skalweit A, Stegbauer J, Persson PB and Seeliger E. Angiotensin II response in afferent arterioles of mice lacking either the endothelial or neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R429-R437, 2008.
121. Peppiatt-Wildman CM, Crawford C and Hall AM. Fluorescence imaging of intracellular calcium signals in intact kidney tissue. *Nephron Exp Nephrol* 121: e49-e58, 2012.
122. Persson AE, Brown R, Liu R and Ollerstam A. Nitric oxide modulates and adenosine mediates the tubuloglomerular feedback mechanism. *Acta Physiol Scand* 176: 91-94, 2002.
123. Persson AE, Lai EY, Gao X, Carlstrom M and Patzak A. Interactions between adenosine, angiotensin II and nitric oxide on the afferent arteriole influence sensitivity of the tubuloglomerular feedback. *Front Physiol* 4: 187, 2013.

124. Persson AE, Muller-Suur R and Selen G. Capillary oncotic pressure as a modifier for tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 236: F97-102, 1979.
125. Pittner J, Wolgast M and Persson AE. Perfusate composition influences nitric oxide homeostasis in rat juxtamedullary afferent arterioles. *Acta Physiol Scand* 179: 85-91, 2003.
126. Pollock DM, Jenkins JM, Cook AK, Imig JD and Inscho EW. L-type calcium channels in the renal microcirculatory response to endothelin. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F771-F777, 2005.
127. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M and Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10480-10484, 1991.
128. Rabadi MM and Lee HT. Adenosine receptors and renal ischaemia reperfusion injury. *Acta Physiol (Oxf)* 213: 222-231, 2015.
129. Ratliff BB, Sekulic M, Rodebaugh J and Solhaug MJ. Angiotensin II regulates NOS expression in afferent arterioles of the developing porcine kidney. *Pediatr Res* 68: 29-34, 2010.
130. Reinhardt HW and Seeliger E. Toward an Integrative Concept of Control of Total Body Sodium. *News Physiol Sci* 15: 319-325, 2000.
131. Ren Y, Garvin JL, Falck JR, Renduchintala KV and Carretero OA. Glomerular autacoids stimulated by bradykinin regulate efferent arteriole tone. *Kidney Int* 63: 987-993, 2003.
132. Rosivall L, Rinder DF, Champion J, Khosla MC, Navar LG and Oparil S. Intrarenal angiotensin I conversion at normal and reduced renal blood flow in the dog. *Am J Physiol* 245: F408-F415, 1983.
133. Sato K, Kojima M and Dohi Y. Contractile responses in human umbilical arteries to hyper- and hypotonic solutions. *J Vasc Res* 31: 240-246, 1994.
134. Schildroth J, Rettig-Zimmermann J, Kalk P, Steege A, Fahling M, Sendeski M, Paliege A, Lai EY, Bachmann S, Persson PB, Hocher B and Patzak A. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol Dial Transplant* 26: 779-789, 2011.
135. Schmidt R.F. and Thews G. *Physiologie des Menschen*. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
136. Schnermann J. Concurrent activation of multiple vasoactive signaling pathways in vasoconstriction caused by tubuloglomerular feedback: a quantitative assessment. *Annu Rev Physiol* 77: 301-322, 2015.

137. Schnermann J, Traynor T, Yang T, Arend L, Huang YG, Smart A and Briggs JP. Tubuloglomerular feedback: new concepts and developments [In Process Citation]. *Kidney Int Suppl* 67: S40-5, 1998.
138. Schnermann J, Weihprecht H and Briggs JP. Inhibition of tubuloglomerular feedback during adenosine1 receptor blockade. *Am J Physiol* 258: F553-F561, 1990.
139. Seeliger E, Lohmann K, Nafz B, Persson PB and Reinhardt HW. Pressure-dependent renin release: effects of sodium intake and changes of total body sodium. *Am J Physiol* 277: R548-R555, 1999.
140. Selen G, Muller-Suur R and Persson AE. Activation of the tubuloglomerular feedback mechanism in dehydrated rats. *Acta Physiol Scand* 117: 83-89, 1983.
141. Selen G and Persson AE. Hydrostatic and oncotic pressures in the interstitium of dehydrated and volume expanded rats. *Acta Physiol Scand* 117: 75-81, 1983.
142. Shirreffs SM, Merson SJ, Fraser SM and Archer DT. The effects of fluid restriction on hydration status and subjective feelings in man. *Br J Nutr* 91: 951-958, 2004.
143. Sibbald JR, Hubbard JI and Sirett NE. Responses from osmosensitive neurons of the rat subfornical organ in vitro. *Brain Res* 461: 205-214, 1988.
144. Singer HA and Peach MJ. Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 4: 19-25, 1982.
145. Speckmann E.-J., Hescheler J. and Köhling R. *Physiologie*. Elsevier, 2013.
146. Steinhausen M, Snoei H, Parekh N, Baker R and Johnson PC. Hydronephrosis: a new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int* 23: 794-806, 1983.
147. Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A and Kaley G. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 85: 288-293, 1999.
148. Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J and Schnermann J. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9983-9988, 2001.
149. Takeda-Nakazawa H, Harada N, Shen J, Kubo N, Zenner HP and Yamashita T. Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide production in outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 230: 93-104, 2007.
150. Takenaka T, Suzuki H, Okada H, Inoue T, Kanno Y, Ozawa Y, Hayashi K and Saruta T. Transient receptor potential channels in rat renal microcirculation: actions of angiotensin II. *Kidney Int* 62: 558-565, 2002.

151. Tamaki T, Kiyomoto K, He H, Tomohiro A, Nishiyama A, Aki Y, Kimura S and Abe Y. Vasodilation induced by vasopressin V2 receptor stimulation in afferent arterioles. *Kidney Int* 49: 722-729, 1996.
152. Thorup C, Kornfeld M, Winaver JM, Goligorsky MS and Moore LC. Angiotensin-II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries. *Pflugers Arch* 435: 432-434, 1998.
153. Thureau K and Schnermann J. Die Natriumkonzentration an den Macula densa Zellen als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat (Mikropunktionsversuche). *Klin Wochenschr* 43: 410-413, 1965.
154. Thureau K, Schnermann J, Nagel W, Horster M and Wahl M. Composition of tubular fluid in the macula densa segment as a factor regulating the function of the juxtaglomerular apparatus. *Circ Res* 21: Suppl-90, 1967.
155. Trippodo NC, McCaa RE and Guyton AC. Effect of prolonged angiotensin II infusion on thirst. *Am J Physiol* 230: 1063-1066, 1976.
156. Tsuji M, Ohta T, Ogawa R, Tamura Y and Yoshizaki Y. Pressure gradients between intraluminal and extraluminal spaces may affect the potassium induced contraction in the rabbit's basilar arteries. *Neurol Res* 16: 305-309, 1994.
157. Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PB, Norregaard R, Jensen BL, Sorensen GL and Skott O. Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ Res* 93: 1258-1266, 2003.
158. VERNEY EB. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 135: 25-106, 1947.
159. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest* 56: 577-581, 1996.
160. Vivas L, Chiaraviglio E and Carrer HF. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. *Brain Res* 519: 294-300, 1990.
161. Vos PF, Boer P, Braam B and Koomans HA. Efficacy of intrarenal ACE-inhibition estimated from the renal response to angiotensin I and II in humans. *Kidney Int* 47: 274-281, 1995.
162. Wagner C. Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int* 73: 547-555, 2008.
163. Wang D, Chen Y, Chabrashvili T, Aslam S, Borrego Conde LJ, Umans JG and Wilcox CS. Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 14: 2783-2789, 2003.

164. Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP and Schnermann J. Vasomotor effects of purinergic agonists in isolated rabbit afferent arterioles. *Am J Physiol* 263: F1026-F1033, 1992.
165. Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP and Schnermann J. Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am J Physiol* 266: F227-F239, 1994.
166. Wendel M, Knels L, Kummer W and Koch T. Distribution of endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 54: 1193-1203, 2006.
167. Wenzel UO, Krebs C and Benndorf R. The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11: 37-41, 2010.
168. Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand* 179: 217-223, 2003.
169. Wilcox CS and Welch WJ. Interaction between nitric oxide and oxygen radicals in regulation of tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand* 168: 119-124, 2000.
170. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
171. Yao ST, Antunes VR, Paton JF and Murphy D. Osmotic regulation of neuronal nitric oxide synthase expression in the rat amygdala: functional role for nitric oxide in adaptive responses? *J Neurosci Res* 85: 410-422, 2007.
172. Yuan BH, Robinette JB and Conger JD. Effect of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 258: F741-F750, 1990.
173. Zhang R, Harding P, Garvin JL, Juncos R, Peterson E, Juncos LA and Liu R. Isoforms and functions of NAD(P)H oxidase at the macula densa. *Hypertension* 53: 556-563, 2009.
174. Zhang Z, Kindrat AN, Sharif-Naeini R and Bourque CW. Actin filaments mediate mechanical gating during osmosensory transduction in rat supraoptic nucleus neurons. *J Neurosci* 27: 4008-4013, 2007.
175. Zhu X, Manning RD, Jr., Lu D, Gomez-Sanchez CE, Fu Y, Juncos LA and Liu R. Aldosterone stimulates superoxide production in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F529-F535, 2011.

Abbildungsverzeichnis:

Abb.-Nr.	Inhalt	Seite
Abb. 1	Die Regulation der Osmolalität	12
Abb. 2	Experimenteller Aufbau	22
Abb. 3	Videomikroskopisches Bild einer perfundierten afferenten Arteriole	23
Abb. 4	Experimenteller Aufbau	26
Abb. 5	Verlauf der Basaldurchmesser von afferenten Arteriolen	30
Abb. 6	Angiotensin II-Konzentration-Wirkungskurven für 0,1% und 4% Albumin	31
Abb. 7	Angiotensin II-Konzentration-Wirkungskurven für 0,1%, 4,0% Albumin + Mannitol	32
Abb. 8	Farbkodierte Darstellung einer afferenten Arteriole und zugehörigem Glomerulus	33
Abb. 9	Verlauf der DAF-Fluoreszenz	33
Abb. 10	Effekt von 0,1%iger vs. 4%iger Albuminlösung auf die Reaktivität von großen renalen Arterien	34
Abb. 11	Mittelwerte der EC50 von großen Nierenarterien. Angiotensin II	35
Abb. 12	Effekt von 0,1%iger und 4%iger Albuminlösung auf die Relaxation	35
Abb. 13	Mittelwerte der EC50 von großen Nierenarterien der Maus, ACh	36
Abb. 14	Effekt einer 4%igen Albuminlösung auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion	37
Abb. 15	Mittelwerte der EC50 von großen Nierenarterien der Ratte	37
Abb. 16	Relative mRNA-Expression der NOS-Isoformen in afferenten Arteriolen	38
Abb. 17	Relative mRNA-Expression der NOS-Isoformen in großen Nierenarterien	39

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hayar Mohammed, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss extrazellulärer Proteinkonzentration auf die Reaktivität afferenter Arteriolen der Niere“ 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/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 Publikationen

Ich habe Anteil an folgender Publikation:

Gao X, Liu ZZ, Mohammed H, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlstrom M, Patzak A and Persson AEG. Extravasal albumin concentration modulates contractile responses of renal afferent arterioles. *Acta Physiol (Oxf)* 2017.

Beitrag: 10%

Für oben genannte Publikation habe ich Effekte von Mannitol auf die Ang II-Reaktivität afferenter Arteriolen untersucht, welche in die Abb. 1 dieser Publikation eingeflossen sind.

Ich habe in Zusammenarbeit mit Frau Diana Braun Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ang II in Interlobararterien der Maus (0,1% und 4% Albumin) erstellt. Diese Ergebnisse finden sich in Abb. Abb. 7 (Gao et al., 2017).

In weiteren Experimenten habe ich die DAF-Fluoreszenz für die Abschätzung der NO-Konzentration bei 0,1%, 4% Protein und unter L-NAME-Behandlung in afferenten Arteriolen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 (Gao et al., 2017) dargestellt.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf:

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

Publikationsliste:

Gao X, Liu ZZ, **Mohammed H**, Braun D, Zhuge Z, Liu M, Lai EY, Jansson L, Carlstrom M, Patzak A and Persson AEG. Extravasal albumin concentration modulates contractile responses of renal afferent arterioles. *Acta Physiol (Oxf)*: 222, 2017, doi: 10.1111/apha.12925.