

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1. Maus als Tiermodell**

Die renale Autoregulation wurde in der Vergangenheit überwiegend *in vitro* an isoliert perfundierten Nieren verschiedener Tierspezies [47, 48, 69, 123, 133, 150] oder an Einzelnephronen untersucht, um das druckabhängige Verhalten des Nierenblutflusses und auch die damit verbundene Regulation der Nierengefäße [21, 46, 150] besser zu verstehen.

Untersuchungen der renalen Autoregulation *in vivo* sind erst in jüngerer Zeit in der Literatur an vielen unterschiedlichen wachen oder anästhesierten Säugetieren unter anderem an Hunden [64], Kaninchen [26, 33, 35], Katzen [41, 125] oder Ratten [3, 63, 90] beschrieben. Mit fortschreitender Miniaturisierung der Messgeräte konnten auch Kreislaufuntersuchungen an Mäusen und anderen Kleinnagern durchgeführt werden [23, 116, 134].

Langzeitmessungen an wachen Tieren spielen eine immer größere Rolle und werden durch technische Weiterentwicklungen der Implantate immer praktikabler. Bei dieser Untersuchungsform werden Einflussfaktoren auf die renale Durchblutung, beispielsweise die Anästhesie reduziert. [35, 36, 38, 39, 107, 110]. Somit werden Untersuchungsbedingungen ähnlich denen unter normalen physiologischen Verhältnissen geschaffen. Langzeituntersuchungen der renalen Autoregulation an wachen Mäusen sind unserer Kenntnis nach in der Literatur nicht zu finden. Allerdings entwickelten neben unserer auch andere Arbeitsgruppen Modelle zur Akutmessung des renalen Blutflusses an narkotisierten Mäusen [5, 42, 81].

Ein wichtiges Ziel unserer Untersuchungen war die Analyse autoregulatorischer Phänomene und der zugrunde liegenden Mechanismen bei Mäusen. Insbesondere sollte geklärt werden, wie sich die Autoregulation unter Überexpression von ET-1 oder Fehlen der endothelialen NO-Aktivität verändert. In einer Nebenfragestellung sollte geprüft werden, ob die in unserer Arbeitsgruppe genutzten Methoden zur Untersuchung der renalen Hämodynamik an die Spezies Maus angepasst werden kann. Exemplarisch sollten diese Methoden an den Mäusen verschiedener Stämme erprobt werden, um die Breite des Methodeneinsatzes zu sichern. Ein weiterer Beweggrund das Tiermodell Maus zu verwenden, war die Prüfung der Vergleichbarkeit der

gewonnen Ergebnisse mit Literaturangaben sowie bisher gewonnen Versuchsdaten der eigenen Arbeitsgruppe bei transgenen bzw. nicht-transgenen Versuchstieren gleicher und differenter Tierspezies, beispielsweise Ratte oder Hund.

Bei den Untersuchungen war zu erwarten, dass neben den chirurgischen und messtechnischen Problemen auch solche auftreten, die sich aus der Spezies Maus ergeben könnten. Mäuse zeigen im Vergleich zu anderen Säugetieren eine hohe Empfindlichkeit auf hämodynamische und vegetative Einflüsse, beispielsweise gegenüber Veränderungen des Blutvolumens durch Infusionen oder auf operativen Stress.

Mäuse reagieren schneller mit hämodynamischen Effekten, sie weisen starke Blutdruckschwankungen auf, haben eine geringere kardiale Auswurfleistung, und ein geringeres Gesamtblutvolumen (1,5 ml) im Vergleich zu Ratten. Ferner war das Körpergewicht der ausgewachsenen 3 bis 4 Monate alten Ratten, bei denen die Methode zur Charakterisierung der Autoregulationsmechanismen entwickelt wurde [142], näherungsweise 10 mal größer als das Körpergewicht erwachsener Mäuse (Ratte: 300g bis 400g versus Maus: 31g bis 45g). Diese Faktoren erklären die hohe Sensibilität der Homöostase der Maus auf äußere und innere Reize, die bei Untersuchungen von Ratten, Katzen oder Hunden besser toleriert werden. Diese Einflussfaktoren müssen beim Vergleich der Ergebnisse mit anderen Säugetieren berücksichtigt werden [91].

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt bei der Verwendung des Tiermodells Maus stellt der höhere technische Aufwand sowie die höhere Empfindlichkeit der Messgeräte im Vergleich zu Untersuchungen an der Ratte dar und damit verbunden auch eine Potenzierung möglicher Fehlerquellen [91]. Die größere Zahl der zur Verwendung kommenden Implantate sowie Messsonden komplizierte die Messungen zusätzlich und führte zu zahlreichen Fehlmessungen.

### **5.1.2. Geschlecht der Tiere**

Geschlechtsspezifische hormonelle Schwankungen haben großen Einfluss auf die Herz-Kreislauf-Physiologie der Tiere. Da bei weiblichen Tieren, bedingt durch den ovariellen Zyklus auch mit einem zyklisch variierendem Angiotensin I – Spiegeln und damit bedingten Blutdruckschwankungen [91] gerechnet werden muss, erfolgten die Untersuchungen an männlichen Tieren.

### **5.1.3. Untersuchungszeitpunkt**

Mäuse zeigen gegenüber dem Menschen eine invertierte circadiane Rhythmik. Mäuse sind nachtaktiv. Aus organisatorischen Gründen war es weder möglich den Tieren einen invertierten Zyklus anzubieten, noch die Versuche nachts durchzuführen. Somit muss mit den entsprechenden Einflüssen auf die Versuchsergebnisse gerechnet werden. Dabei spielt vor allem eine mögliche Verschiebung der RBF-Autoregulationsgrenzen eine Rolle. Zur Minimierung dieser Faktoren führten wir die Versuchsreihen immer zur gleichen Tageszeit zwischen 8 – 15 Uhr durch. Allerdings kann man auch davon ausgehen, dass die Versuchsbedingungen wie der offene Bauchraum, Implantate und weitere Versuchsbedingungen viel stärkere Einflüsse auf die gemessenen Größen gehabt haben als die tageszeitlichen Schwankungen.

### **5.1.4. Anästhesie**

Hauptanforderungen an die Narkose waren, ein Anästhetikum zu verwenden, das die suffiziente Spontanatmung der Mäuse nicht gefährdete, gut steuerbar war und die Hämodynamik der Maus (Herzfrequenz, Blutdruck) unbeeinflusst ließ. Wir wählten nach Ausschluss aller atemdepressiven Anästhetika und nach umfangreichen Vorversuchen in der Arbeitsgruppe sowie Angaben aus der Literatur [143] eine Kombinationsnarkose aus Ketamin (5 mg/ml) und Xylazinhydrochlorid (0,032 mg/ml) wovon 0,09 ml/100g KG intraperitoneal injiziert wurden. Hierunter konnte eine gute Hypnose und Analgesie der Tiere unter suffizienter Spontanatmung ohne Intubation oder zusätzliche Sauerstoffgabe erreicht werden. Durch eine intraperitoneale Einmalgabe war eine einfache Anwendbarkeit gegeben und führte zu einer sicheren, gut steuerbaren Narkose von 40 bis 50 Minuten. Nachgaben beim Abflachen des Narkosestadiums waren intraoperativ, nach Freilegung des Abdominalsitues, durch Auftropfen der Kombinationsnarkoselösung auf den Darm problemlos möglich. Der Eintritt der Narkose erfolgte spätestens nach 2 Minuten. Als sicheres Zeichen für ein tiefes Narkosestadium galt das Erlöschen der Eigenreflexe. Unerwünschte Wirkungen können bei Verwendung der geringen Mengen vernachlässigt werden.

### **5.1.5. Operation**

Als effektivster Zugangsweg zur linken Niere sowie Aorta mit adäquaten Aktionsradius wählten wir die mediane Laparotomie und bei weiterem Platzbedarf gegebenenfalls eine erweiterte

Laparotomie. Der dabei erzeugte Operationsstress führte wahrscheinlich neben der Freisetzung von Katecholaminen zu einer Stimulierung des Vegetativums und zu Veränderungen der Druckverhältnisse im abdominalen Gefäßbett mit Beeinflussung der Vorlast des Herzens. In Vorversuchen konnte mit einer Blutdruckmessung in der A. femoralis gezeigt werden, dass die Laparotomie und die Verlagerung des Darmes zu einem bleibenden Blutdruckabfall von 10 - 20 mmHg über die Versuchszeit führt. Um den Operationsstress zu minimieren, wurden nach sorgsamer Präparation schnellstmöglich die Messgeräte implantiert. Für die Versuchsreihen wurde primär industriell gefertigtes Equipment verwendet. Eigene entwickelte Implantate (Bsp. Drossel) orientierten sich an den anatomischen Gegebenheiten der Spezies Maus. Die Gesamtoperationszeit dauerte nicht länger als 30 Minuten und die notwendige aortale Abklemmzeit war weniger als 2 Minuten. Flüssigkeitsverluste wurden durch Infusion von 4 % Albuminlösung mit 0,5 % des KG/h per Infusiomaten über einen intraaortalen Katheter ausgeglichen. Zusätzlich wurden Kompressen mit körpertemperiertem NaCl 0,9 % über die offenen Darmschlingen gelegt, um zusätzliche Flüssigkeitsverluste auszugleichen. Blutverluste waren minimal.

#### **5.1.6. Postoperative Maßnahmen**

Nach Abschluss der Versuchsreihen wurden die Tiere durch einen intrakardialen Scherenschnitt getötet. Da die Tiere unter tiefer Narkose standen und wir schnellstmöglich arbeiteten, wurde kein Tier gequält oder musste lange leiden. Im Anschluss präparierten wir die linke Niere aus dem Nierenlager heraus, schnitten diese längs auf und kontrollierten sowohl optisch als auch durch Messung die Lage der Laserkabel im Nierenparenchym. Das Herz präparierten und lösten wir vom Aortenstamm, um es anschließend aus der Herzhöhle zu entnehmen, zu vermessen und zu wiegen. Traten überproportional dimensionierte Herzkammern auf, die auf eine Herzinsuffizienz mit reduzierter kardialer Auswurfleistung schließen ließen, wurden diese Versuchstiere nicht in die Auswertung übernommen.

#### **5.1.7. Messungen**

##### **5.1.7.1. Ultraschallmesskopf**

Die Messung des Gesamtflusses der linken Nierenarterie bzw. Nierenvene erfolgte unabhängig vom Gefäßquerschnitt über Ultraschalllaufzeitdifferenzbestimmung durch einen an die

anatomischen Verhältnisse der Maus angepassten Ultraschallmesskopf, der an eine Messeinheit gekoppelt war. Somit ist bei den gewonnenen Daten von korrekten Ergebnissen auszugehen. Auch wurden präzise Ergebnisse gewonnen, wenn sich der Gefäßdiameter des Nierengefäßes während der Versuche änderte. Interindividuelle Gefäßquerschnitte der linken A. renalis bzw. V. renalis konnten dadurch auch ausgeglichen werden.

Vor Implantation des Ultraschallmesskopfes erfolgte eine Kalibrierung durch die Bestimmung des absoluten Nullpunktes des renalen Gesamtflusses (RBF). Hierzu wurde der Ultraschallmesskopf in ein Gefäß mit isotoner Kochsalzlösung getaucht und nach einstündiger erschütterungsfreier Standphase des Gefäßes der Nullpunkt bestimmt. Weitere in der Literatur beschriebene Verfahren zur Nullpunktbestimmung sind die renale Gesamtflussbestimmung eines Gefäßes post mortem über einen definierten Zeitraum [35] und die Bestimmung des Nullflusses über ein Zeitintervall nach Abklemmen der A. renalis [50, 126]. Bei beiden von uns verworfenen Verfahren werden minimale jedoch hämodynamisch relevante Flüsse der Nierenarterie vernachlässigt und eine unerlässliche präexperimentelle Kalibrierung sowie absolute Nullpunktbestimmung nicht durchgeführt. Traten Störungen im Signal des Nierenflusses auf, beispielsweise durch mechanische Irritationen des Flusskopfes, wurden diese gemessenen Daten nicht in der Auswertung berücksichtigt. Somit ist bei den von uns gemessenen Gesamtflüssen von Ergebnissen mit guter Plausibilität auszugehen.

#### **5.1.7.2. Fiberoptische Lichtleiterkabel**

Neben der Registrierung des Gesamtblutflusses der Niere (RBF), führten wir Messungen des Flusses im Nierenparenchym über zwei optisch leitende Kunststofffasern durch (siehe Methodik 3.4.). Diese wurden blind am oberen Nierenpol ins Nierenparenchym in unterschiedliche Tiefen (1 mm und 2 mm) eingeführt, um Flusssignale in Nierenrinde und -mark zu messen. Da das Nierenparenchym nicht homogen strukturiert ist, in der Nierenrinde zahlreiche Gefäße verzweigen, das Nierenmark mehrschichtig aufgebaut ist und beide ein strahlenförmiges angeordnetes Kelchsystem durchzieht, konnte die exakte Lage der implantierten Kunststofffasern nur vermutet werden. Die korrekte Lagekontrolle war erst post mortem möglich. Folglich waren an die Lichtleiterkabel angrenzende Strukturen, die Einfluss auf die Messung hatten, nicht bekannt. Um diesen Faktor zu minimieren, wählten wir als Implantationsstelle den oberen Nierenpol, von dem in Vorversuchen empirisch Mark- und Rindenschichtdicken ermittelt wurden.

Das Prinzip der Messung beruhte auf dem Doppler-Effekt. Vom Messgerät wurde Licht in ein Gewebevolumen von ca. 1 Kubikmillimeter um die Kunststofffaser gestreut und teilweise durch Gewebe reflektiert. Beim Auftreffen des Lichtstrahls auf sich bewegende Teilchen im Nierenparenchym, vor allem Erythrozyten, erfährt dieser nach dem Doppler-Effekt eine Frequenzänderung. Diese Frequenzverschiebung kann in eine Geschwindigkeitsänderung umgerechnet werden. Die Anzahl und Geschwindigkeit der Teilchen in den unterschiedlichen Gewebeschichten wurde gemessen und diese im Messgerät zu willkürlichen Einheiten [arbitrary units (AU)] umgerechnet. Auf diese Weise konnte nach Registrierung von Ausgangswerten eine Zu- oder Abnahme der lokalen Fluxe in unterschiedlichen Parenchymschichten über eine relative Änderungen erfasst werden.

Diese Methode zur Messung der lokalen Fluxe in Nierenrinde und -mark ist störanfällig. Aktive und passive Bewegungen der Versuchstiere oder auch Tischbewegungen führten zu kurzzeitigen, vielfach höheren Messwerten beider Fluxe. Traten solche Artefakte auf, wurden sie im Protokoll vermerkt und später anhand der genannten Charakteristika in der Ergebnisauswertung identifiziert als auch eliminiert.

Als Ausgangswert wählten wir den Mittelwert des Versuchstieres, der einige Minuten direkt nach Anschluss der Lichtleiterkabel an das Messgerät registriert wurde, ohne eine vorherige Blutdruckmanipulation durchzuführen.

Die Definition des Nullpunktes bereitete erhebliche Schwierigkeiten. Die Bestimmung des Nullpunktes wird in der Literatur von den Untersuchern unterschiedlich gehandhabt, beispielsweise durch eine geeichte Lösung des Herstellers [35], durch Bestimmung des Nullpunktes über Subtraktion der mittleren Flusswerte präexperimentell von denen post mortem bzw. erhaltener Signalwerte [3, 53] oder Messung des Flusses in Geweben über einen definierten Zeitraum nach Flussunterbrechung [126].

Die Schwierigkeit der Definition des Nullwertes bei diesem Messverfahren zeigt sich noch deutlicher bei der Betrachtung dazu erhobener experimenteller Versuchsergebnisse. Kernick [68] konnte in seinen Studien zeigen, dass es nach Unterbrechung des Blutflusses im Gewebe bei Verwendung der Laser-Doppler-Spektroskopie initial zu einem Anstieg des Signals kommt, bevor dieses abfällt. Auch konnte gezeigt werden, dass 10 - 15 Minuten nach Unterbindung des

Nierenarterienflusses noch Signale im Gewebe messbar waren. Selbst isoliertes und avitales Gewebe [129, 22, 68] wies in dopplerspektroskopischen Studien Flusssignale auf. Keine Flusssignale fanden sich hingegen bei Untersuchungen von tiefgefrorenen Gewebestücken [84], während Temperaturerhöhung durch Erwärmung des Gewebes zu einer Zunahme des Flusssignals führte [22].

Die Brownsche Molekularbewegung der Teilchen im Gewebe ist von der Temperatur abhängig. Diese ist bei in vivo Untersuchungen durch die Körpertemperatur der Versuchstiere vorgegeben und soll möglichst nicht verändert werden. Die definitive Bestimmung des Nullpunkts bei Verwendung dieser Methodik ist somit ausgeschlossen. Kernick [68] erklärte die beobachteten Phänomene durch die Brownsche Molekularbewegung interstitieller Makromoleküle, die somit den ausschlaggebenden Faktor bei der Definition des Nullpunktes dieser Messmethode darstellen. Er schlägt daher vor nach Blutflussunterbrechung von 3-5 Minuten das Signal zu registrieren, und von den folgenden Ergebnissen zu subtrahieren. Diese Ischämiezeit wird jedoch von der Niere nicht ohne Schädigung toleriert. Aus diesem Grund registrierten wir die Signale der renalen Fluxe bei einer kürzeren Unterbrechung der renalen Durchblutung und subtrahierten diese von den gemessenen Daten. Diese Werte gingen dann in die Relativwertberechnung ein.

### **5.1.7.3. Druckmesswandler**

Die Messung des renalen Perfusionsdrucks (RPP) erfolgte über einen intaortalen Katheter an dem ein Druckabnehmer angeschlossen war. Dieser leitete über einen 12-Bit-AD-Wandler die Messwerte des RPP, die auf dem Bildschirm dargestellt wurden, an den Computer. Die Zweipunkt-Kalibrierung des Druckabnehmers erfolgte durch den Anschluss eines mit einem analogen Manometer verbundenen Druckreservoirs bei 0 mmHg und 100 mm Hg.

## **5.1.8. Material**

### **5.1.8.1. Drossel**

Um Änderungen der Autoregulation des renalen Blutflusses auf verschiedene Blutdruckschwankungen untersuchen zu können, regulierten wir den renalen Perfusionsdruck (RPP) über eine Drossel, die um die Aorta abdominalis suprarenal befestigt war. Eine Sufflation

der Drossel führte zu einer Kompression des aortalen Lumens und einer Verminderung des RPP, während eine Desufflation den RPP wieder erhöhte.

Somit ist festzuhalten, dass der computergesteuerte Regelkreis zur Durchführung von Perfusionsdruckänderungen bei in vivo Untersuchungen an der Maus ein effektives als auch sehr genaues Mittel zur Steuerung des renalen Perfusionsdrucks darstellt. Materialermüdungen oder akute allergische Immunreaktionen der Tiere auf die Baumaterialien traten in keinem Versuch auf.

#### **5.1.8.2. Intraaortaler Katheter**

Für die Messung des renalen Mitteldrucks und zur intraarteriellen Infusion verwendeten wir einen intraaortal, infrarenal platzierten Polyurethan-Katheter, der mit Gewebekleber fixiert war. Unter Verwendung eines innenbeschichteten Katheters und Spülung mit 0,2 ml einer 2 % Heparinlösung wurden Offenheitsraten von mehreren Stunden erzielt, die mit nicht-innenbeschichteten Kathetern aus Polyethylen nicht erreicht wurden. Bei Letzteren kam es in Vorversuchen zu Katheterverschlüssen durch Thrombusbildung, die häufige Katheterspülungen und eine aufwendige Protokollierung notwendig machten. Ferner waren lange Zeitintervalle nötig, bis sich die Flüsse nach einer Spülung normalisierten. Auch die damit verbundene zusätzliche Volumenbelastung (pro Spülung 0,2 – 0,5 ml) hatte Einfluss auf die Flussparameter, Blutviskosität, Blutdruck der Tiere und die Ergebnisse. Es wurde dann nicht mehr unter Ausgangsbedingungen sondern unter Volumenexpansion gemessen. Gewonnene Daten waren nur sehr eingeschränkt verwendbar. Aus diesem Grund verwendeten wir innenbeschichtete Katheter.

## 5.2. Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1. Statische Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass statische und dynamische Untersuchungen der RBF-Autoregulation an der Spezies Maus möglich sind und detaillierte Aussagen über die beteiligten Mechanismen gewonnen werden können. Untersuchungen an der Spezies Maus sind in der Literatur nur vereinzelt zu finden. Die Untersucher beschränkten sich bei diesen Versuchreihen an verschiedenen Mausstämmen unter differenten Versuchsbedingungen auf Parameter wie mittlerer arterieller Druck (MAP) sowie Ermittlung der GFR. Vereinzelt finden sich auch Angaben über den gemessenen renalen Blutfluss (RBF) [9, 23, 44, 115, 134]. Einen Überblick über die in der Literatur verfügbaren und ermittelten renalen Kenndaten bei Mäusen unter Ausgangsbedingungen ohne hämodynamische Manipulation in Gegenüberstellung mit unseren gewonnenen Daten gibt Tabelle 1.

Hieraus geht hervor, dass die von uns ermittelten Daten für den RBF unter Ausgangsbedingungen von 1,0 ml/min bis 1,2 ml/min gut übereinstimmen mit den Literaturangaben über verschiedene Mausarten. Unterschiede ergeben sich bei den gemessenen Blutdrücken unter Ausgangsbedingungen, die in unseren Versuchreihen je nach Mausstamm zwischen 35 mmHg bis 75 mmHg lagen, und damit niedriger waren als einige in der Literatur gemessenen Werte. Ursachen hierfür finden sich in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel Narkoseform, offenes Abdomen und spontane Luftatmung.

Angaben zur RBF-Autoregulation bei Mäusen, beispielsweise der unteren Grenze der Autoregulation sind in der Literatur selten angegeben. Die untere Grenze der RBF-Autoregulation lag bei allen Mausstämmen in unseren Versuchreihen zwischen 40 mmHg bis 75 mmHg. Vallon et al. [134] fanden bei anästhesierten nNOS Knock-Out und Kontrollmäusen eine untere Grenze der Autoregulation um 85 mmHg. Ferner fanden Rahgozar et al. [150] bei C57BL6-Mäusen unter Anhebung des Perfusionsdruckes und anschließender stufenweiser Erniedrigung an isoliert perfundierten Nieren einen Autoregulationsbereich von 65 mmHg bis 85 mmHg. Der Unterschied zu unseren Ergebnissen könnte auf die different verwendete Methodik in der Versuchsdurchführung und Auswertung zurückzuführen sein. Vallon et al. [134] legierten vor Messung des MAP die A. mesenterica superior und weitere coeliacale Arterien. Somit wurde eine starke Sympathikusaktivierung provoziert. Der anschließend bestimmte MAP lag bei  $118 \pm 1,5$  mmHg und entspricht folglich nicht den physiologischen Ausgangsbedingungen der Maus.

Anschließend wurde der RPP manuell, stufenweise durch Verschluss einer supraaortalen Klemme reduziert und der RBF beobachtet. Die untere Grenze der Autoregulation entsprach dem Punkt, an dem bei weiterer Reduktion des

Untersucher	Mausstamm	RBF (ml/min) or (ml/min*100g bwt)** (ml/min*g kwt)*	MAP/RPP in (mmHg)	LFC in (AU or V)	LFM in (AU or V)	Versuchsbedingungen
Eigene Werte	Wildtypmäuse ET-1 C57BL6 NMRI NO Knock-Out	für alle 1,0 bis 1,2 ml/min	RPP 60 bis 80	80 AU bis 220AU	120AU bis 220AU	Ausgangsbedingungen Akutversuche unter Narkose Spontanatmung, offenes Abdomen
Vallon et al., 2001 [134]	nNOS Knock-Out control	1.7 +/- 0.2 ml/min 1.4. +/- 0.1 ml/min	MAP 118+/-1.5* MAP 117+/-2*			Ausgangsbedingungen akut Versuche unter Narkose *nach Legierung A.mesent.sup. Tracheotomie,100% O2
Brown et al., 2001 [17]	A1 Knock-Out C57BL6		MAP 85 +/- 1 MAP 97 +/- 2			Ausgangsbedingungen akut Versuche unter Narkose Spontanatmung,40% O2
Cervenka et al., 1999 [23]	AT1A Knock-Out control (C57BL6)		MAP 68 +/- 4 MAP 89 +/- 3			Ausgangsbedingungen akut Versuche unter Narkose Tracheotomie,95% O2,5%CO2
Gross et al., 2000 [44]	AT2-Knock-Out control	6.2+/-1.0 * 6.7 +/-0.9 *	RPP 88 +/- 7 RPP 75 +/- 4	1.6 V 2.6 V	0.8 V 1.0 V	Ausgangsbedingungen akut Versuche unter Narkose Tracheotomie Spontanatmung
Gross et al., 1999 [43]	DOCA+Statin control (NMRI)	3.6 +/- 0.7* 4.7 +/- 0.4*	MAP 78 +/- 6 MAP 74 +/- 5	1.7 V 2.5 V	0.7 V 0.9 V	Ausgangsbedingungen Versuche ohne Narkose Tracheotomie,tail Manschette,
Butz et al., 2000 [19]	C57BL6		MAP 128 +/- 6			Ausgangsbedingungen Versuche ohne Narkose
Mattson 1998 [89]	Swiss Webster		MAP 116 +/- 1			Ausgangsbedingungen Versuche ohne Narkose
Beierwaltes et al.,2001 [9]	eNOS Knock-Out C57BL6	1.71 +/- 0.06** 1.66 +/- 0.09**	MAP 100 +/- 3 MAP 86 +/- 1			Ausgangsbedingungen akut Versuche unter Narkose
Shindo et al., 2002 [122]	ET-1 Wildtypmäuse		RPP 121 +/-1 RPP 120 +/- 2			Ausgangsbedingungen akut Versuche ohne Narkose

Legende: V : Volt  
AU:arbitrary units  
RBF:renal blood flow  
MAP:mean arterial pressure  
A1:Adenosine A1 Knock-Out  
AT1A:Angioensin IA Knock-Out  
RPP:renal perfusion pressure  
eNOS:endothelial NO Knock-Out  
nNOS:neuronal NO Knock out

**Tabelle 1** Überblick renaler Kenndaten bei der Spezies Maus

RPP der RBF in gleichem Verhältnis stark abfiel und nicht mehr näherungsweise konstant gehalten werden konnte. Unter den beschriebenen unphysiologischen Untersuchungsbedingungen lag die untere Grenze der Autoregulation höher als die in unseren Versuchsreihen ermittelte. Auch Gross et al. [43] beschrieb unter Verwendung einer ähnlichen

Methodik wie Vallon et al. [134] bei Untersuchungen an anästhesierten DOCA (NMRI) Mäusen eine untere Grenze der Autoregulation bei 70 mmHg. Er konnte zusätzlich zeigen, dass die Legierung der A. mesenterica superior sowie weiterer coeliacaler Arterien und damit hämodynamische Manipulation durch Sympathikusstimulierung zu einem artifiziellen Anstieg des MAP von ca. 78 mmHg auf ca. 117 mmHg führte. Der ermittelte Autoregulationsbereich von Rahgozar et al. [150] an isolierten Mausnieren unter Ausgangsbedingungen basiert auf der Beobachtung der RPP-RBF Beziehung unter künstlich erhöhtem Perfusionsdruck, der anschließend stufenweise reduziert wurde. Unter Verwendung eines Autoregulationsindex wie Van Dokkum et al. [135] in verwendeten, ermittelte sich der oben genannte Autoregulationsbereich. Die verwendete Methodik entspricht jedoch nicht den Verhältnissen in vivo bei der Maus, sondern stark unphysiologischen Bedingungen, wie unsere Ergebnisse zeigen, wo der Autoregulationsbereich eher zwischen 35 mmHg bis 65 mmHg liegt und somit deutlich niedriger ist (siehe Abbildung 12).

Bei Vergleich unserer Ergebnisse mit den Literaturangaben gehen wir davon aus, dass die von uns angewandte Methodik den physiologischen Verhältnissen der Maus eher entspricht, da unsere Versuchsreihen ohne eine längere Abklemmung wesentlicher Kreislaufabschnitte mit daraus resultierender Veränderung des Metabolismus und des vegetativen Nervensystems durchgeführt wurden. Deshalb können nur Daten verglichen werden, die mit einer vergleichbaren Methodik gewonnen wurden. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe und auch Angaben in der Literatur an wachen wie narkotisierten Ratten, bei denen eine vergleichbare Methodik angewandt wurde, zeigen, dass die untere Grenze der Autoregulation bei Ratten zwischen 88 mmHg [38, 111, 139] bis 98 mmHg [14] liegt und damit deutlich höher ist als bei der Maus.

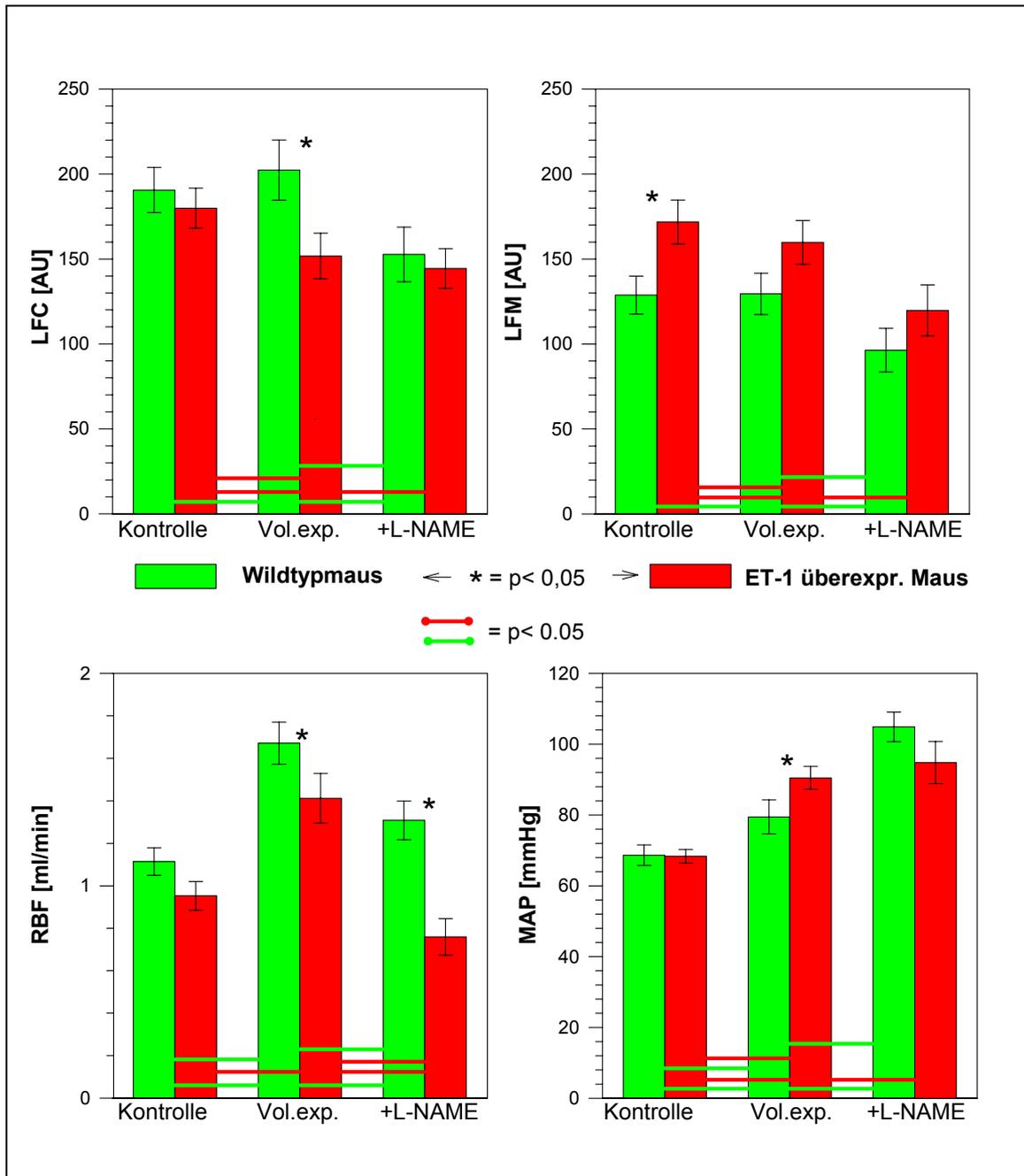
Untersuchungen und Aussagen über an der RBF-Autoregulation beteiligte Mechanismen für die Spezies Maus, deren Charakteristika oder Angaben zur Effektivität fehlen in der Literatur völlig.

## **5.2.2. Dynamische Untersuchungen**

### **5.2.2.1. Einfluss von Volumenexpansion und Hemmung der NO-Synthetasen auf die renale Hämodynamik von ET-1 überexprimierenden Mäusen und Wildtypmäusen**

Drei NO Synthetasen werden unterschieden, eNOS (endotheliales NO System überwiegend im vaskulären Endothel anzutreffen), nNOS (neuronal NO System vor allem in Neuronen) und iNOS (induzierbares NO System, vorrangig gekoppelt an inflammatorische Mediatoren). Auch ist aus Untersuchungen der drei Isoformen am Gastrointestinaltrakt bekannt, dass eNOS und nNOS calciumabhängig aktiviert werden, während die iNOS Aktivierung an die Calmodulin Aktivität gekoppelt ist [87]. Die Verteilung der Isoformen im Organismus ist gewebeabhängig. Hocher et al. [51] konnten in immunhistochemischen Untersuchungen an glatten Muskelzellen intrarenaler Arterien von Mäusen mit Überexpression von ET-1 eine hohe iNOS Aktivität nachweisen.

Eine Volumenexpansion mit isotoner Kochsalzlösung führt zu einem Anstieg des renalen Blutflusses bei unverändertem Blutdruck und damit Anstieg des Leitwertes. Diese Beobachtung konnte auch bei den Wildtypmäusen gemacht werden. Wird eine Volumenexpansion hingegen mit Vollblut durchgeführt, kommt es bei relativ unverändertem RBF zu einem Anstieg des Systemblutdruckes, was Inoue et al. [60] an Ratten beobachtete. Dieses unterschiedliche Verhalten bei Hämodilution mit Vollblut wurde auf die differente Beeinflussung des anliegenden shear stress auf das Gefäßendothel zurückgeführt. In eigenen Versuchsreihen zeigten wir, dass bei Mäusen mit Überexpression von ET-1 die Volumenexpansion mit isotoner Kochsalzlösung zu einem Reaktionsmuster führt, wie es unter einer Volumenexpansion mit Vollblut beschrieben worden ist (siehe Abbildung 17). Ursachen für dieses Verhalten könnte sein, dass einerseits der shear stress an der Gefäßwand nicht perzipiert wird oder dass die Vermittlung, die unter anderem über einen Anstieg des endothelialen NO hervorgerufen wird, gestört ist. Ferner spricht für diese Hypothese, dass die Ergebnisse von Hocher et al. [51], an dem hier vorliegenden Tiermodell eine erhöhte iNOS Aktivität nachweisen konnten.

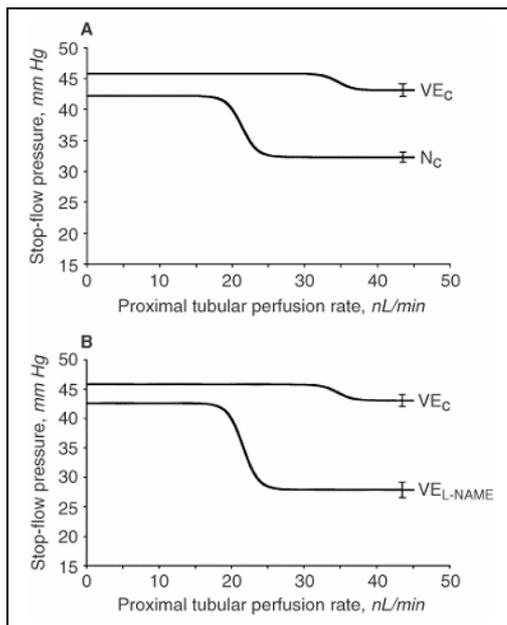


**Abbildung 17** Verhalten von LFC, LFM, RBF und MAP bei ET-1 überexprimierenden Mäusen (roter Balken), Wildtypmäusen (grüne Balken) unter Volumenexpansion (Vol.exp) mit isotoner Kochsalzlösung als auch Volumenexpansion mit L-NAME (+ L-NAME, Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Wir nehmen an, dass eine Erhöhung der iNOS Aktivität die endotheliale NOS (eNOS) hemmen kann. Dies wiederum könnte erklären, warum die ET-1 überexprimierenden Mäuse auf Volumenexpansion mit physiologischer Kochsalzlösung reagierten als ob keine shear stress-Änderung vorlag.

Volumenexpansion führt zu einer Hemmung des TGF und ist vielfach in der Literatur beschrieben worden. Dies können wir auch bei den untersuchten Kontrollmäusen bestätigen. Untersuchungen von Brown et al. [17] konnten zeigen, dass eine Hemmung der NO Synthetase durch L-NAME zu einer Wiederherstellung des TGF unter Volumenexpansion führt (siehe Abbildung 18, B). Dies können wir ebenfalls in den hier vorgestellten Untersuchungen bestätigen. Brown et al. [17] schlossen aus ihren Untersuchungen, dass hier die spezifische Hemmung der nNOS ursächlich beteiligt wäre.

Unter der Annahme, dass die erhöhte NO Produktion aufgrund der erhöhten iNOS Aktivität nicht nur die eNOS sondern auch die nNOS Freisetzung hemmt, müsste bei den Mäusen mit einer Endothelin-1 Überexpression und einer erhöhten iNOS Aktivität Volumenexpansion zu einer geringeren oder keiner Hemmung des TGF führen. Dies entspricht auch den in diesen Untersuchungen erhobenen Daten. Die Ursache warum eine zusätzliche unspezifische Hemmung



**Abbildung 18** Vergleich des proximalen Tubulusflusses (mmHg) und Perfusionsrate (nl/min) A) unter Ausgangsbedingungen (N<sub>c</sub>), Volumenexpansion (VE<sub>c</sub>) und B) VEC sowie VEC mit L-NAME Gabe (VE<sub>L-NAME</sub>) aus [17].

der NO-Synthetase bei diesen Mäusen eine totale Hemmung des TGF hervorruft kann besonders im Lichte der entgegen gesetzten Reaktion der Kontrollmäuse zur Zeit nicht interpretiert werden (siehe Abbildung 16).

### **5.2.2.2. Einfluss von ET-1 und NO auf die Schwingungsdauer der Autoregulationsmechanismen**

Bei Betrachtung der Schwingungsdauer (Abbildung 16, Mitte) sind bei beiden Mausstämmen deutlich 3 Gruppen von Schwingungsdauern zu differenzieren. Unter den verschiedenen Versuchsbedingungen sind bei Gegenüberstellung beider Mausstämme differente Verhaltensmuster zu erkennen. Auffällig ist bei beiden Mausstämmen die Zunahme der myogenen Schwingungsdauer nach Volumenexpansion und anschließender L-NAME Gabe sowie eine Abnahme der Schwingungsdauer des metabolisch gesteuerten Mechanismus nach Volumenexpansion bei den Kontrolltieren, während es bei den ET-1 überexprimierenden Mäusen unter gleichen Bedingungen zu einer Zunahme kommt (Abbildung 16, Mitte). Dies ist entsprechend auch im Verhalten der Zeitkonstante wieder zu finden, der benötigten Zeit bis zur Wiederherstellung des renalen Blutflusses nach Abklemmung unter den differenten Versuchsbedingungen. Wronski et al. [142] konnten in Untersuchungen an Ratten eine Verlängerung der Schwingungsdauer des myogenen Mechanismus nach Gabe von L-NAME beobachten (Kontrolle  $T = 9,5 \text{ s} \pm 1,2 \text{ s}$ , nach L-NAME  $T = 11,5 \text{ s} \pm 1,1 \text{ s}$ ). Bei Betrachtung unserer Ergebnisse zeigt sich unter Volumenexpansion und anschließender L-NAME Gabe eine signifikante Zunahme der Schwingungsdauer des myogenen Mechanismus bei Vergleich von ET-1 überexprimierenden Mäusen (ET-1) und Wildtypmäusen (Ausgangsbedingungen Wildtyp  $T = 7 \text{ s}$ ; ET-1  $T = 5,6 \text{ s}$ ; Volumenexpansion und L-NAME Wildtyp  $T = 9,7 \text{ s}$ , ET-1  $T = 9,7 \text{ s}$ ) (Abbildung 16, Mitte). Ursache für die Verlängerung der Schwingungsdauer unter Volumenexpansion und L-NAME bei unseren Versuchsreihen oder alleiniger L-NAME Gabe bei Ratten [142] ist noch offen. Anzunehmen ist, dass die nicht-selektive Ausschaltung der NO Synthetaseaktivität durch L-NAME zu einer langsameren myogenen Reaktionsfähigkeit der Gefäße führt, die sich in einer Verlängerung der Schwingungsdauer ausdrückt.

### **5.2.2.3. Einfluss von ET-1 und NO auf die Zeitkonstante der Autoregulationsmechanismen**

Da der metabolisch gesteuerte Mechanismus erst durch die hier vorgestellte Arbeit und Arbeiten von Just et al. [63, 64, 66] dargestellt worden ist und seine Rolle in der RBF-Autoregulation noch nicht bekannt ist, bleibt eine Interpretation der beobachteten Differenzen der Zeitkonstante zwischen ET-1 überexprimierenden Mäusen und Kontrolltieren (Wildtypmäusen) unter Volumenexpansion offen (siehe Abbildung 16, unten).

Die errechnete Zeitkonstante wird im Wesentlichen durch die Veränderung des langsamen, metabolisch gesteuerten Mechanismus beeinflusst. Unter der Annahme, dass die Volumenexpansion über shear stress-Veränderungen zu einem Anstieg der renalen Durchblutung führt, müssten vorhandene Metabolite schneller abtransportiert werden, was zu einer Beschleunigung dieser Regulation beitragen würde. Dies kann man bei den Kontrollmäusen beobachten und zeigt sich in einer Abnahme der Zeitkonstante. Eine Hemmung der shear stress-abhängigen Reaktion durch L-NAME müsste folglich zu einer Verlangsamung des Regulationsmechanismus führen und zeigt sich in einer Zunahme der Zeitkonstante (siehe Abbildung 16, unten). Unter der Annahme, dass bei den transgenen Tieren die shear stress-Empfindlichkeit aufgehoben oder gesenkt ist, dürfte sich wie beobachtet, der renale Blutfluss unter Volumenexpansion nicht ändern. Dies könnte den fehlenden Abfall der Zeitkonstante bei Volumenexpansion erklären, jedoch nicht wie hier beobachtet einen Anstieg. Ursachen für diese signifikante Veränderung können erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden (siehe Abbildung 16, unten).