

Aus der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten,
rheumatologische und immunologische Erkrankungen,
Medizinische Klinik II

(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Floege)

Der Einfluss extrazellulärer Strömungspotentiale auf die glomeruläre Filtration - eine Untersuchung am Modell der Ratte

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Lukas Hendrik Esch

aus Bonn

Berichter: Herr Professor Dr. med. Marcus Möller
Herr Privatdozent Dr. med. Ralf Hausmann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. März 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere	2
1.1.1 Grundlagen	2
1.1.2 Grenzen des Verständnisses	3
1.1.3 Bisherige Modelle und Lösungsansätze	4
1.2 Elektrische Flusspotentiale im Glomerulus	9
1.2.1 Grundlagen	9
1.2.2 Konsequenzen für die glomeruläre Filtration	11
1.2.3 Systemische Implikationen	13
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Versuchsmaterial	17
3.1.1 Versuchstiere	17
3.1.2 Elektrotechnisches Material	17
3.1.3 Operationsmaterial	18
3.1.4 Medikamente	21
3.2 Versuchsaufbau und -durchführung	23
3.2.1 Elektrotechnischer Aufbau	23
3.2.2 Grundlegende OP-Techniken	24
3.2.3 Versuchsvariante mit evertierter Niere ‘im Löffel’	26
3.2.4 Versuchsvariante mit Niere ‘in situ’	28
3.3 Versuchsauswertung	29
3.3.1 Elektrotechnische Auswertung	29
3.3.2 Biochemische Methoden	31

4	Ergebnisse	33
4.1	Aufbringen des Feldes auf die Niere	33
4.2	Proteinurie im elektrischen Feld	40
4.2.1	Klinische Chemie	40
4.2.2	SDS-Gelelektrophorese	42
4.3	Blutdruck	45
4.4	Elektrotechnische Ergebnisse	47
5	Diskussion	48
5.1	Aufbringen des Feldes auf die Niere	48
5.2	Proteinurie im elektrischen Feld	52
5.2.1	Klinische Chemie	52
5.2.2	SDS-Gelelektrophorese	52
5.3	Blutdruck	53
5.4	Elektrotechnische Ergebnisse	54
5.5	Zusammenfassende Beurteilung	55
6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	58
8	Danksagung	65
9	Erklärung zur Datenaufbewahrung	66
10	Erklärung über den Eigenanteil	67
11	Lebenslauf	68

Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Ampere</i>
A./Aa.	<i>Arteria/Arteriae</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
CK	<i>Creatinkinase</i>
Da	<i>Dalton</i>
F	<i>Farad</i>
FP	<i>Foot Process</i>
G	<i>Gauge</i>
GBM	<i>glomeruläre Basalmembran</i>
GFB	<i>glomeruläre Filtrationsbarriere</i>
GFR	<i>glomeruläre Filtrationsrate</i>
HMV	<i>Herzminutenvolumen</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
I.E.	<i>internationale Einheiten</i>
IPN	<i>isoliert perfundierte Niere</i>
KG	<i>Körpergewicht</i>
ln	<i>Logarithmus naturalis</i>
N.	<i>Nervus</i>
Ω	<i>Ohm</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
s.c.	<i>subcutan</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
UAW	<i>unerwünschte Arzneimittelwirkung</i>
U	<i>Unit</i>
V	<i>Volt</i>
V./Vv.	<i>Vena/Venae</i>
W	<i>Watt</i>
ZVK	<i>zentraler Venenkatheter</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Prinzip der glomerulären Filtration	2
Abb. 1.2:	Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere	3
Abb. 1.3:	Modelle und Hypothesen zur Funktion des glomerulären Filters	5
Abb. 1.4:	Die Gel-Hypothese	8
Abb. 1.5:	Das elektrische Potential über dem glomerulären Filter	9
Abb. 1.6:	Das Strömungspotential im Detail	10
Abb. 1.7:	Auf Albumin wirkende Kräfte im Glomerulus	10
Abb. 1.8:	Anti-Verstopfungsmechanismus im Glomerulus	12
Abb. 1.9:	Einfluss der Podozyten-Anatomie auf das Strömungspotential	13
Abb. 2.1:	Die filternde Kapillare im elektrischen Feld	15
Abb. 3.1:	Versuchstier: Die Wistar-Ratte	17
Abb. 3.2:	Material: Spannungsquellen und Oszilloskop	18
Abb. 3.3:	Material: Plexiglashalterung mit Elektrode	19
Abb. 3.4:	Material: Kupfergewebe und Elektrode	20
Abb. 3.5:	Versuchsaufbau: Schaltplan im Wechselstrom	23
Abb. 3.6:	Versuchsaufbau: Schaltplan im Gleichstrom	23
Abb. 3.7:	Versuchsaufbau: Schema der Niere im Plexiglas-‘Löffel’	27
Abb. 4.1:	Übersicht zu OP-Beginn	34
Abb. 4.2:	Präparation der V. femoralis	34
Abb. 4.3:	ZVK-Anlage an V. femoralis	35
Abb. 4.4:	Präparation der A. carotis	36
Abb. 4.5:	Carotis-Katheter und Druckaufnehmer	36

Abb. 4.6:	Präparation der linken Niere	37
Abb. 4.7:	Aufbringen der Kupferelektroden	38
Abb. 4.8:	Abdominalsitus mit Ureter-Katheter	38
Abb. 4.9:	Messungen	39
Abb. 4.10:	Relative Proteinurie (individuell)	41
Abb. 4.11:	Relative Proteinurie (gemittelt)	42
Abb. 4.12:	SDS-Gelelektrophorese 1/2	43
Abb. 4.13:	SDS-Gelelektrophorese 2/2	44
Abb. 4.14:	Invasive Blutdruckmessung - Inhalationsnarkose	45
Abb. 4.15:	Invasive Blutdruckmessung - Injektionsnarkose	46

1 Einleitung

Die Frage „Wie funktioniert der glomeruläre Filter?“ gehört wohl zu den ältesten Überlegungen in der Nephrologie überhaupt. Sie beschäftigt Wissenschaftler aus allen Teilen der Welt seit über 150 Jahren [Bowman, 1842, Ludwig, 1843].

Störungen der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) spielen eine entscheidende Rolle bei der Mehrzahl der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Die Proteinurie ist dabei Leitsymptom dieser Schrankenstörung bei vielen glomerulären Erkrankungen und stellt darüber hinaus einen gut belegten unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar [Matsushita et al., 2010].

Dank intensiver Bemühungen konnten in der Vergangenheit viele grundlegende Zusammenhänge der glomerulären Filtration beobachtet und verstanden werden. Nur bei wenigen Erkrankungen haben diese Erkenntnisse um die glomerulären Abläufe und ihr pathomorphologisches Korrelat jedoch bereits Einzug in die klinische Medizin gehalten. Auch bleiben wichtige Fragen weiter nur unzureichend beantwortet: So produziert die Niere im Laufe eines Menschenlebens von etwa 80 Jahren über fünf Millionen Liter praktisch proteinfreien Primärharn. Dabei gelangen mehr als 300 Tonnen Plasmaproteine in den glomerulären Filter! Trotz dieser beträchtlichen Belastung zeigt die nur ca. 0,1 bis 0,5 m² große Filtrationsmembran keinerlei Anzeichen von Verstopfung! Bis heute konnte nicht abschließend geklärt werden, wie die Niere diese beeindruckende Aufgabe meistert. Auch besteht in der wissenschaftlichen Welt noch kein allgemeiner Konsens darüber, wie die Aufgaben im Filtrationsprozess den einzelnen Komponenten der Blut-Harn-Schranke zuzuordnen sind. Es ist nach wie vor nicht vollständig verstanden, welcher Bestandteil der Membran die höchste Selektivität aufweist und so eine entscheidende Rolle in der glomerulären Filtration übernimmt [Haraldsson et al., 2008].

Hausmann et al. konnten erstmals experimentell nachweisen, dass auch *elektrische Effekte* im Glomerulus auftreten und schreiben ihnen eine wesentliche Rolle bei der Funktion der GFB zu [Hausmann et al., 2010]. Die Berücksichtigung filtrationsabhängiger elektrischer Potentiale in diesem neuen Modell stellt dabei einen eleganten Lösungsansatz zu einigen Rätseln dar, die der glomeruläre Filter bisher aufwarf. Sie vermag ein grundsätzliches Umdenken im Verständnis der Abläufe im Glomerulus einzuläuten: weg von der Idee eines rein *passiven* Mechanismus, hin zur Annahme eines *aktiven* Filtrationsprozesses.

Die vorliegende Arbeit soll diese neue Hypothese zur glomerulären Filtration im Tierversuch an der Ratte verifizieren: Unmittelbar von außen auf die Niere aufgebrachte elektrische Felder interferieren mit den endogenen Feldern des Organs. Damit kann ihr Einfluss auf die glomeruläre Filtration genauer untersucht werden.

1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

1.1.1 Grundlagen

Filtration

Rund 20 % des Herzminutenvolumens (in Ruhe etwa 1,0-1,2 L/min) werden über die Aa. afferentes der ca. einer Million Glomeruli zugeführt. Etwa 10 % davon (100-120 ml/min) werden über die 0,1 bis 0,5 m² große und ca. 0,5 µm dicke glomeruläre Filtrationsmembran in die Bowmansche Kapsel abgepresst [Shea & Morrison, 1975]. Auf diese Weise entstehen jeden Tag rund 180 Liter praktisch proteinfreier Primärharn (Abb. 1.1).

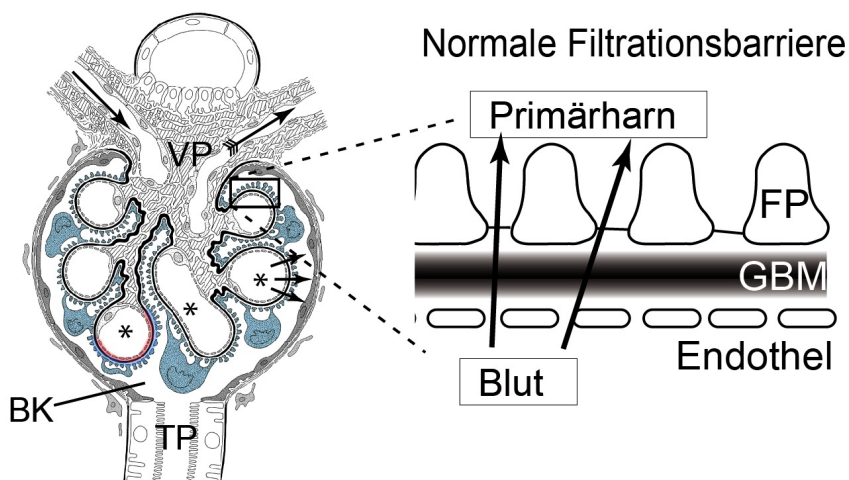


Abbildung 1.1: Prinzip der glomerulären Filtration

Der renale Blutfluss erreicht und verlässt über den vaskulären Pol (VP, lange Pfeile) den Glomerulus. In den filtrierenden Kapillaren (*) wird Primärharn über die Filtrationsbarriere abgepresst, gelangt in die Bowmansche Kapsel (BK) und fließt schließlich im tubulären Pol (TP) ab; verändert nach [Moeller & Tenten, 2013].

Aufbau

Die glomeruläre Filtrationsmembran zeigt einen mehrschichtigen Aufbau (Abb. 1.2) [Deen et al., 2001, Haraldsson et al., 2008, Jarad & Miner, 2009, Rhodin, 1955]: Die Kapillarschlingen im Nierenkörperchen werden von fenestriertem Endothel ausgekleidet. Dieses ist von einer Glykokalyx bedeckt, die aus vorwiegend negativ geladenen Glykoproteinen besteht. Harnwärts schließt sich eine drei-geschichtete Basalmembran an, welche gleichermaßen von Endothel wie Podozyten synthetisiert wird [Haraldsson et al., 2008]. Die Podozyten bilden Primär- und Sekundärfortsätze aus. Letztere stellen die äußere Schicht der Blut-Harn-Schranke dar und sind untereinander über spezialisierte Zell-Zell-Kontakte, die sog. Schlitzdiaphragmen, verbunden. Die Diaphragmen wiederum bestehen vorwiegend aus den großen Protein-Komplexen Nephlin-related-protein 1 (NEPH1) [Kestilä et al., 1998] sowie Cadherin FAT1 und besitzen u.a. Signalfunktion zur Regulation der Podozyten [Huber & Benzing, 2005].

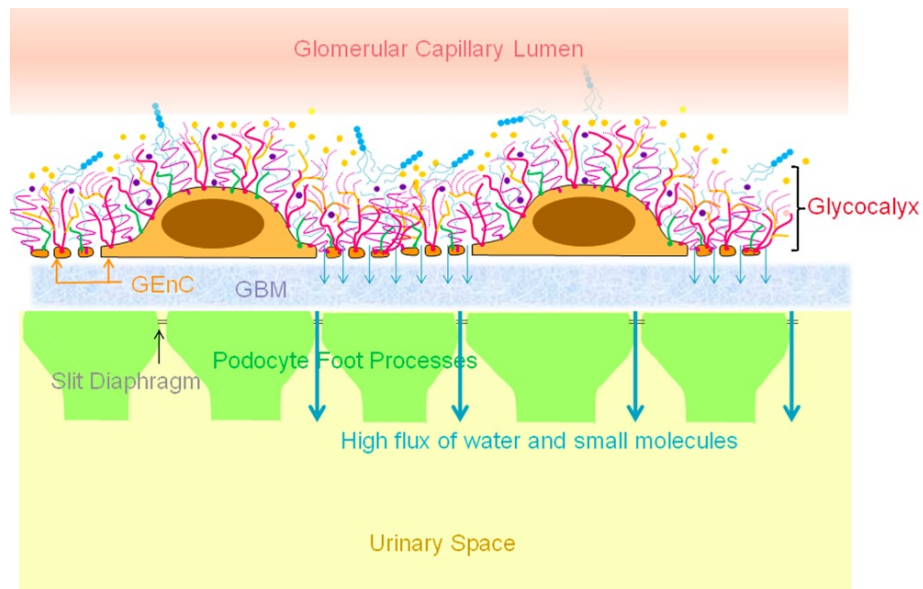


Abbildung 1.2: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB)

Fenestrierte Endothelzellen (GEnC) kleiden die Kapillarschlingen des Glomerulus aus und sind mit einer Schicht negativ geladener Glykoproteine und Proteoglykane (Glycocalyx) bedeckt. In Richtung Bowmanscher Kapsel (Urinary Space) stehen Sekundärfortsätze der Podocyten (grün) über Schlitzdiphragmen (grau) in Verbindung. Dazwischen liegt die glomeruläre Basalmembran (GBM). Plasma wird durch die Endothelfenster und die Schlitzdiphragmen als Primärharn abfiltriert (blaue Pfeile); verändert nach [Singh & Satchell, 2011].

1.1.2 Grenzen des Verständnisses

Der anatomische Aufbau der GFB ist mittlerweile gut untersucht und zahlreiche Untersuchungen der Vergangenheit konnten wichtige Einblicke in die Funktionsweise des glomerulären Filters liefern. Dennoch bleiben wichtige Aspekte bislang unzureichend verstanden, darunter auch die Fragen:

- **Warum verstopft der Filter auch nach Jahrzehnten nicht?**

Wie zuvor beschrieben, ist der glomeruläre Filter lebenslang einer enormen Belastung durch Plasmaproteine ausgesetzt, die ihn zu überladen drohen. Bis heute bleibt es ein Mysterium der Natur, warum mehr als 300 Tonnen Plasmaproteine im Laufe eines Menschenlebens kaum Spuren am Filter hinterlassen - geschweige denn ihn verstopfen.

- **Welcher Anteil des Filters hat die größte Bedeutung?**

Zahllose wissenschaftliche Publikationen beschäftigen sich mit diesen weiteren, fundamentalen Fragen der Nephrologie: Wieso hat die Natur eben diesen Filter hervorgebracht, den wir heute kennen? Welche Bedeutung kommt seinen individuellen Komponenten zu? Gibt es einen distinkten Anteil, der den Ultrafilter der Niere repräsentiert? Oder ist es letztlich nur das Zusammenspiel aller Beteiligten, das dieses Meisterwerk der Evolution funktionieren lässt?

• **Weshalb ist Mikroalbuminurie ein kardiovaskulärer Risikofaktor?**

Kardiovaskuläre Erkrankungen bleiben die Todesursache Nummer eins in Europa [World Health Organization, 2012] und stellen Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften weltweit vor größte Herausforderungen. Für diese Erkrankungen wurde die Proteinurie als Risikofaktor bereits vor rund 30 Jahren in der Framingham-Studie identifiziert [Kannel et al., 1984]. Heute ist die Bedeutung der Mikroalbuminurie als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse dank hochwertiger Studien gut belegt und findet in der medizinischen Fachwelt breite Zustimmung [Matsushita et al., 2010].

Nicht genügend verstanden ist jedoch bisher, welcher *pathophysiologische Mechanismus* für diesen Zusammenhang von gestörter Filterfunktion und Atherosklerose verantwortlich ist. Ist Albuminurie schlicht die Folge des erhöhten glomerulären Druckes z.B. im Rahmen einer Hochdruckerkrankung [Volpe et al., 2003]? Oder ist sie doch als Ausdruck einer generalisierten Endotheldysfunktion zu verstehen [Deckert et al., 1989, Mogensen, 1994]? Welche Vorgänge auch immer eine Rolle spielen mögen - von neuen Erkenntnissen zu Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen könnten weltweit viele Millionen Menschen profitieren.

1.1.3 Bisherige Modelle und Lösungsansätze

Die bisherigen Untersuchungen des glomerulären Filters haben zur Entwicklung mehrerer Hypothesen bzw. Theorien hinsichtlich seiner Funktion geführt. Mit Ausnahme der Albumin-Wiederaufnahme-Hypothese (s.u.) geht die überwiegende Mehrheit der bisherigen Modelle von einer für Makromoleküle weitestgehend 'dichten' Barriere aus, die ihrer Barrierefunktion in Form eines passiven Filters nachgeht. Sie sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

Albumin-Wiederaufnahme-Hypothese

Gemäß dieser Hypothese [Comper et al., 2008, Eppel et al., 2001, Russo et al., 2007] handelt es sich bei der GFB *nicht* um eine für die meisten Plasmaproteine, allen voran Albumin, nahezu impermeable Schranke. Diese Hypothese postuliert vielmehr, dass der glomeruläre Siebkoeffizient für Albumin etwa 50-fach höher liegt [Russo et al., 2007] als bisher angenommen [Tojo & Endou, 1992]. Auf diese Weise könnte ein Vielfaches der bisher bezifferten Menge an Albumin den Filter passieren und in den Primärharn übergehen. Das anfallende Albumin würde dann vom proximalen Tubulusepithel rückresorbiert und lysosomal abgebaut bzw. über einen albuminspezifischen Rückgewinnungsmechanismus dem venösen Gefäßsystem wieder zugeführt [Eppel et al., 2001]. Eine Proteinurie wäre gemäß diesen Vorstellungen somit weniger als *glomeruläre*, sondern vielmehr als *tubuläre* Störung (der Albumin-Rückgewinnung) zu verstehen [Comper et al., 2008].

Die von den Befürwortern dieser These vorgebrachten Daten für relativ hohe Siebkoeffizienten von Albumin (0,034) [Russo et al., 2007] wurden insbesondere aufgrund methodischer Schwächen kritisiert. Sie konnten in unabhängigen Studien nicht verifiziert

werden, sondern zeigten im Gegenteil Werte in der zu erwartenden Größenordnung für eine 'dichte' Filtrationsbarriere (0,001-0,003) [Tanner, 2009]. Darüber hinaus kann die Hypothese nicht erklären, weshalb bei Schäden des Tubulussystems nur verhältnismäßig geringe Proteinmengen im Urin auftauchen, während bei Erkrankungen des Glomerulus eine Proteinurie im nephrotischen Bereich regelhaft zu beobachten ist.

Auch auf die Frage nach Verstopfung des Filters findet die Albumin-Wiederaufnahme-Hypothese keine befriedigende Antwort: Selbst, wenn tatsächlich 50-fach mehr Albumin filtrierte würde als bisher gedacht, blieben noch rund 96 % Albumin (statt bisher ca. 99,98 %) übrig. Die absolute Belastung des Filters wäre damit nur geringfügig gemindert und entspräche noch immer einer gigantischen Menge von mehreren hundert Tonnen Plasmaproteinen, die ihn im Laufe eines Lebens blockieren müssten.

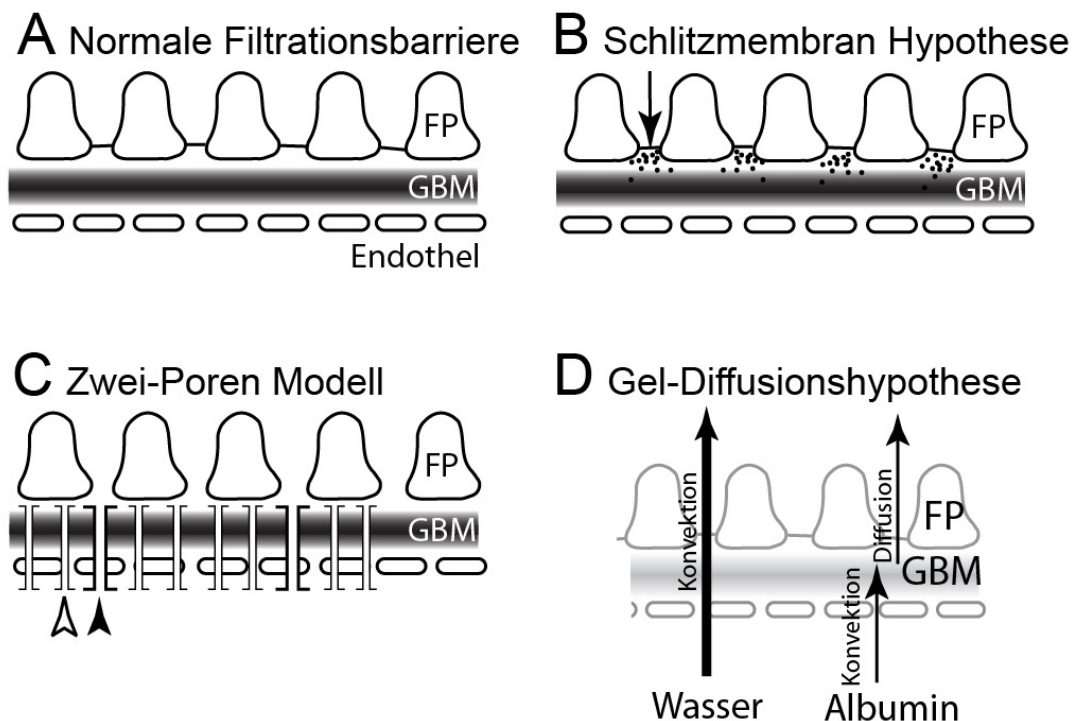


Abbildung 1.3: Modelle und Hypothesen zur Funktion des glomerulären Filters

A Die normale Filtrationsbarriere besteht aus Endothel, GBM und Podozytenfortsätzen (FP) mit Schlitzmembran. **B** Nach der Schlitzmembran-Hypothese steigt die Selektivität des Filters von Endothel zu Podozyten an; die Schlitzmembran ist der Ultrafilter der Niere. **C** Nach dem (Zwei-)Poren-Modell können Wasser und Ionen über kleine Poren (weißer Pfeil) den Filter ungehindert passieren, Makromoleküle werden über große Poren (schwarzer Pfeil) selektiv filtrierte. **D** Gemäß der Gel-Diffusionshypothese passieren Wasser und Ionen die Barriere mittels Konvektion. Albumin gelangt dadurch ebenfalls in den Filter, wird größenselektiv zurückgehalten und kann die Barriere schließlich per Diffusion wieder verlassen; verändert nach [Moeller, 2010].

Schlitzmembran-Hypothese

Nach dieser Hypothese stellt die Schlitzmembran zwischen den Sekundärfortsätzen der Podozyten den entscheidenden, weil selektivsten Anteil des glomerulären Filters dar (Abb. 1.3 B) [Tryggvason & Wartiovaara, 2005]. Somit ist die GFB nach dieser Vorstellung als übereinandergelagertes Konstrukt von Filtern aufsteigender Selektivität zu verstehen. Zwei wesentliche Argumente sprechen dabei gegen die Schlitzmembran-Hypothese. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass der weitaus größte Anteil des Plasmaalbumins die Schlitzmembran erst gar nicht erreicht [Ryan & Karnovsky, 1976]. Darüber hinaus würden in einem solchen Aufbau Albumin und andere Makromoleküle vor der Schlitzmembran als selektivstem Abschnitt der Barriere akkumulieren. Es käme u.a. zu einem Effekt, der als *Konzentrationspolarisation* bezeichnet wird: Die vor der Membran zurückgehaltenen Makromoleküle bilden eine Grenzschicht, reduzieren den (Plasma-) Fluss über die Barriere und verstopfen diese [Porter, 1972].

Poren-Modell

Dieses Modell geht von der Existenz einer oder mehrerer Poren bzw. Kanälen in der glomerulären Filtrationsbarriere aus (Abb. 1.3 C) [Deen et al., 1979, Rippe & Haraldsson, 1994]. Über diese Poren unterschiedlicher Eigenschaften könnte Wasser (in 'kleinen Poren') den Filter frei passieren, Makromoleküle wie Albumin hingegen gingen über gröÙenspezifische 'groÙe Poren' streng kontrolliert in den Primärharn über. Substanzen, für die keine spezifischen Poren in der Barriere vorhanden sind, würden von ihr zurückgehalten. Dabei bestimmt die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Poren den Siebkoeffizienten für die Substanz (d.h. Anzahl 'kleiner Wasserporen' \gg Anzahl 'groÙer Albuminporen'). Folglich wäre die Proteinurie als ein 'Porendefekt' zu interpretieren.

Insgesamt geht das Poren-Modell also ebenfalls von einem rein passiven Filtermechanismus aus. Dabei berücksichtigt es ausschließlich zwei Kräfte, denen Albumin im Filter ausgesetzt ist: *Konvektion* und *Diffusion*. Unter Ersterer versteht man - in diesem Kontext - die Kraft, mit der Albumin durch den Plasmafluss in den Filter gepresst wird. Der konvektive Transport ist dabei im Wesentlichen abhängig vom effektiven Filtrationsdruck des Glomerulus. Diffusion hingegen beschreibt die Kraft des Konzentrationsausgleichs von Albumin zwischen Plasma und Bowmanscher Kapsel. Sie folgt dem Fickschen Diffusionsgesetz und wird damit wesentlich bestimmt durch Konzentrationsdifferenz und Diffusionsstrecke (= Filterdicke).

Bei der Poren-Theorie handelt es sich grundsätzlich um ein rein mathematisches Modell, welches für die Filtrationsvorgänge im Glomerulus lediglich beschreibenden Charakter besitzt. Bis heute konnten keine Poren oder Kanäle innerhalb des Filters nachgewiesen werden. Folglich kann auch das Poren-Modell keine ausreichende Erklärung dafür liefern, weshalb es nicht zur Ansammlung von Plasmaproteinen im Filter kommt, welche diesen verstopfen. Ebenso wenig kann das Modell Auskunft darüber geben, welchen anatomischen Komponenten der Filtrationsbarriere die größte funktionelle Bedeutung zukommt.

Gel-Permeations/Diffusions-Hypothese

Gemäß dieser Hypothese wird die glomeruläre Basalmembran als eine Art *Gel* verstanden und fungiert als selektivster Anteil des Filters (Abb. 1.3 D) [Smithies, 2003]. Endothel und Schlitzmembran besitzen nach dieser Hypothese lediglich strukturgebende Aufgaben, der Basalmembran wird die alleinige Siebfunktion zugesprochen. Während Wasser und Ionen den Filter per Konvektion durchströmen, werden Makromoleküle wie Albumin größen- selektiv im Gel (= GBM) der Barriere zurückgehalten. Nach Eindringen von Albumin in das Gel (*Permeation*) kann es dieses vorwiegend per *Diffusion* wieder in Richtung Bowman- scher Kapsel verlassen. Damit liefert die Hypothese eine denkbare Erklärung weshalb der Filter nie verstopft: Im Gel gefangenes Albumin würde einfach dem Konzentrationsgra- dienten folgen und in den Primärharn diffundieren. Nach der Vorstellung des Autors ist es also diese - von der GFR unabhängige (!) - *Diffusion* und nicht *Konvektion*, welche die treibende Kraft für den Transport von Makromolekülen über den Filter darstellt. Daher würde ein Abfall der GFR nicht die *absolute Menge* an Albumin im Primärharn verän- dern, sondern lediglich seine *Konzentration*, weil weniger Wasser zur Verdünnung hinzu filtriert würde. Die Proteinurie wäre nach dieser Hypothese dann Folge einer Überlastung der tubulären Rückresorptionsmechanismen mit albuminreichem Primärharn.

Das beschriebene Modell trägt zwar der grundlegenden Überlegung Rechnung weshalb der Filter nicht verstopft. Dennoch ist fraglich, ob der - vom Autor selbst als streng kon- stant verstandene - Diffusionsmechanismus allein dazu in der Lage wäre, eine progressive Überladung des Filters mit Plasmaproteinen zu verhindern. Des Weiteren bleibt die Frage unbeantwortet, weshalb Defekte des Endothels oder der Podozyten mit einer Proteinurie einhergehen. Um einen Verlust im nephrotischen Bereich - mit 30 g und mehr Albumin- urie pro Tag - erklären zu können, muss signifikant mehr Albumin als sonst den Filter passieren. Mit der vorgebrachten Hypothese lässt sich dieser Umstand nur unzureichend erklären.

Gel-Hypothese

Hierbei handelt es sich um eine recht komplexe Modellvorstellung, die der glomerulären Basalmembran - ähnlich wie die Gel-Permeations/Diffusions-Hypothese - große funkto- nelle Bedeutung beimisst (Abb. 1.4) [Wolgast et al., 1996]. Sie versteht die GBM eben- falls als ein verdichtetes *Gel*, dessen an Kollagenfasern fixierte negative Ladungen essen- tiell für ihre Struktur und Funktion sind. Diese negativen Ladungen ziehen Gegenionen aus dem Plasma an, mit denen zusammen Wasser in das Gel eindringt. Mit dem Flüs- sigkeitseinstrom steigt in der Folge der Druck innerhalb des Gels bis auf Kapillarniveau und stabilisiert so die GBM. Gleichzeitig richten sich die Fasern durch elektrostatische Wechselwirkung in einem hoch *organisierten Muster* nebeneinander aus. Die streng de- finierten Abstände zwischen den Kollagenfasern bilden dann die Poren des glomerulären Filters (Abb. 1.4 links).

Die Autoren der Gel-Hypothese berücksichtigen auch die Frage nach einem potentiellen Anti-Verstopfungsmechanismus, der die Überlastung des Filters mit Plasmaproteinen verhindern könnte [Wolgast & Persson, 2011]. Wenn Makromoleküle - wie Albumin - in das Gel eindringen, verdrängen sie dort einen Teil der Gegenionen. In der Folge entsteht ein lokaler Überschuss negativer Ladungen, die sich gegenseitig abstoßen und die Kollagenfasern an diesem Ort geringfügig auseinander weichen lassen. Der so gewonnene Raum ermöglicht dem Molekül dann, den Filter zu passieren (Abb. 1.4 rechts).

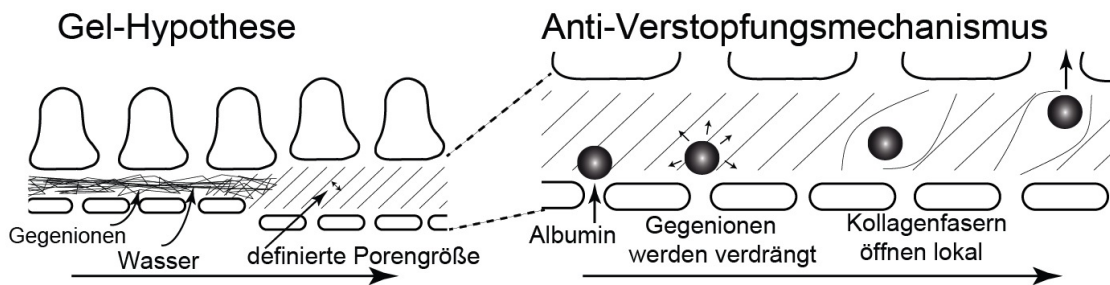


Abbildung 1.4: Gel-Hypothese

Links: Die GBM wird als Gel verstanden, dessen negative Ladungen Gegenionen und Wasser binden; das Gel wird stabilisiert, und Kollagenfasern richten sich neu aus - definierte Poren entstehen. **Rechts:** Albumin gelangt in das Gel und verdrängt lokal Gegenionen; negativer Ladungsüberschuss lässt die Kollagenfasern öffnen und das Albumin wird wieder frei - ein potentieller Anti-Verstopfungsmechanismus; verändert nach [Moeller & Tenten, 2013].

Jede der vorgestellten Theorien leistet einen wichtigen wissenschaftlichen Beitrag für ein besseres Verständnis des glomerulären Filters. Dennoch kann keines der Modelle alle drängenden Fragen der Filtration abschließend beantworten. Die Berücksichtigung *elektrokinetischer Effekte* im Glomerulus kann Licht ins Dunkel einiger Beobachtungen bringen, die bisher noch große Rätsel aufwerfen.

1.2 Elektrische Flusspotentiale im Glomerulus

1.2.1 Grundlagen

Hausmann et al. konnten als Erste eine elektrische Potentialdifferenz über der glomerulären Filtrationsbarriere nachweisen [Hausmann et al., 2010]. Dies gelang an den Nieren des gefleckten Furchenmolches (*Necturus maculosus*) durch gleichzeitige Mikropunktion von Glomeruluskapillare und Bowmanscher Kapsel. Sie vermochten zudem reproduzierbar zu zeigen, dass diese Potentialdifferenz streng filtrationsabhängig erzeugt wurde (Abb. 1.5). Das experimentell bestimmte Potential lag dabei beim Molch im Bereich von 0,045 mV pro 10 cm H₂O effektivem Filtrationsdruck. Für Säugetier-Nieren wurden die Ergebnisse beim Molch zu 0,1 - 0,5 mV bei 5 mmHg effektivem Filtrationsdruck extrapoliert.

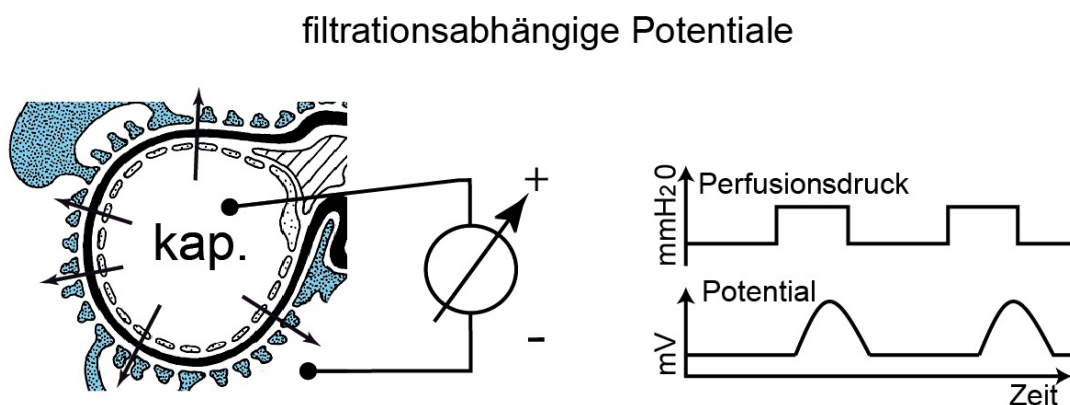


Abbildung 1.5: Das elektrische Potential über dem glomerulären Filter

Zwischen dem Lumen einer filtrierenden Kapillare des Glomerulus und der Bowmanschen Kapsel ist eine Potentialdifferenz messbar. Diese entsteht streng filtrationsabhängig; verändert nach [Hausmann et al., 2012].

Die Autoren schlussfolgerten aus dieser Beobachtung, dass es sich bei der gemessenen Potentialdifferenz um ein flussabhängiges *Strömungspotential* handelt. Darunter versteht man einen elektrokinetischen Effekt, der unter anderem in Erscheinung tritt, wenn eine ionische Lösung mit Hilfe eines Druckgradienten durch einen Kanal gepresst wird, dessen Wände Ladungen tragen [Lyklema, 1991]. Im Falle des glomerulären Filters kommt es zu komplexen elektrophysikalischen Wechselwirkungen der im Plasma gelösten Ionen (v.a. Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ und HCO₃⁻) mit der negativ geladenen Wand der Filtrationsbarriere. Als Folge werden die Anionen des Plasmas (Cl⁻ und HCO₃⁻) geringfügig schneller filtriert als die Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺). Diese Ladungstrennung bewirkt den Aufbau der Potentialdifferenz (Abb. 1.6). Für die mathematischen Hintergründe sei auf das Review von Hausmann et al. verwiesen [Hausmann et al., 2012].

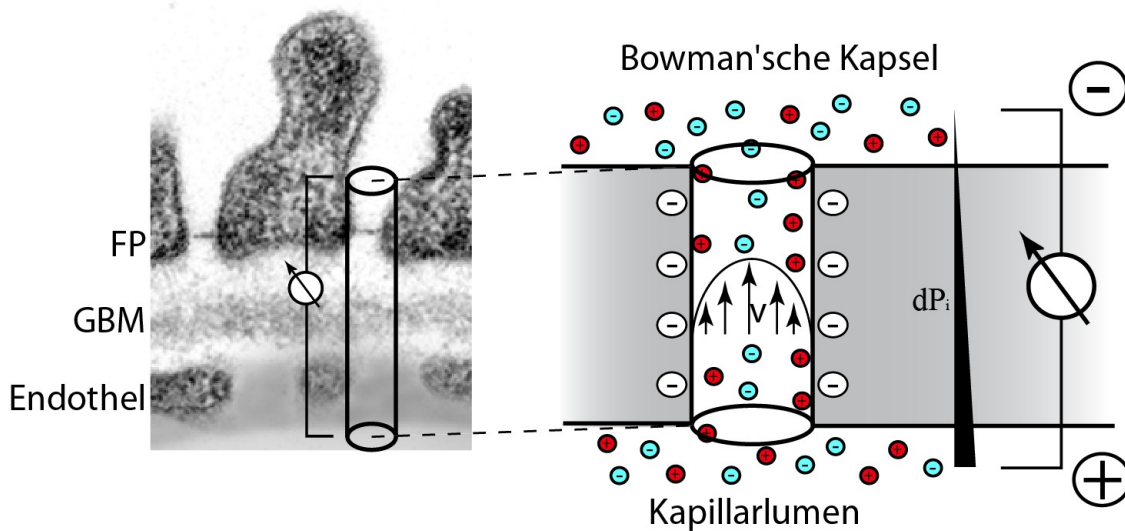


Abbildung 1.6: Das Strömungspotential im Detail

Plasmaionen gehen komplexe Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Wand des Filters ein. Als Folge gelangen Anionen geringfügig schneller als Kationen in die Bowman'sche Kapsel und generieren eine Potentialdifferenz - angetrieben vom effektiven Filtrationsdruck (dP_i); verändert nach [Menzel & Moeller, 2010].

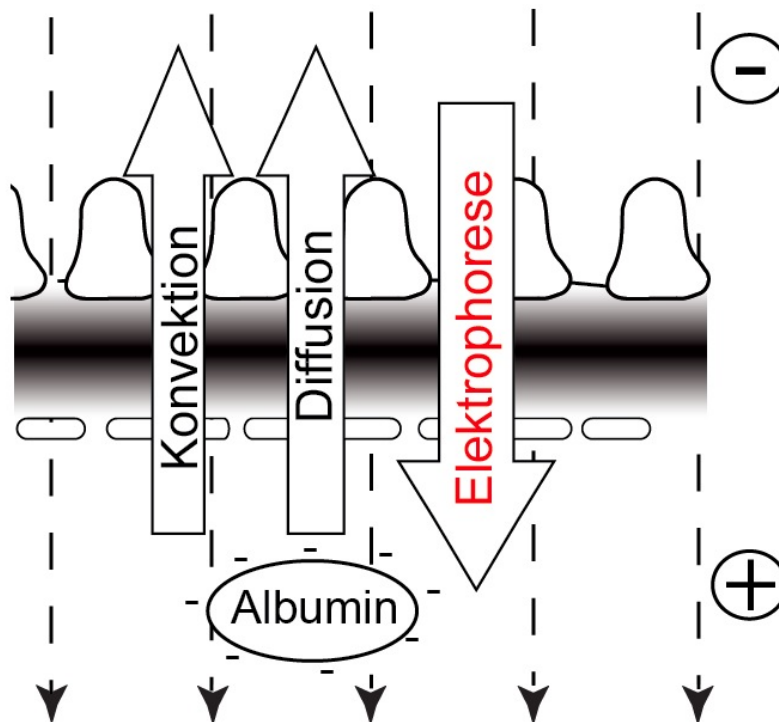


Abbildung 1.7: Auf Albumin wirkende Kräfte

Während Diffusion und Konvektion Albumin in den Filter hinein treiben, wirkt das generierte Strömungspotential (gestrichelte Pfeile) als elektrophoretische Kraft in entgegengesetzter Richtung auf das Albuminmolekül; verändert nach [Moeller & Tenten, 2013].

Aus diesen Überlegungen heraus entwickelten die Autoren Hausmann und Möller ein neues, *elektrokinetisches Modell* zur Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere [Hausmann et al., 2010, Hausmann et al., 2012, Moeller & Tenten, 2013]. Danach beeinflusst das elektrische Potential, welches über der Barriere generiert wird, den Übertritt von Makromolekülen (d.h. insbesondere Plasmaproteinen) in den glomerulären Filter. Finden nach konventionellen Vorstellungen mit *Diffusion* und *Konvektion* nur zwei physikalische Prozesse Berücksichtigung, denen Albumin während der glomerulären Filtration ausgesetzt ist, so tritt in diesem neuen Modell mit der *Elektrophorese* eine dritte, entgegengesetzt wirkende Kraft hinzu (Abb. 1.7). Mit ihrer Hilfe, so die Schlussfolgerung von Hausmann und Möller, könnte Albumin aktiv, d.h. *gegen den Druckgradienten* aus dem Filter heraus und zurück in Richtung Endothel befördert werden. Auf diese Weise liefern beide Autoren mit ihrem Modell eine plausible Erklärung, weshalb der Filter auch nach Jahrzehnten kontinuierlicher Filtration keinerlei Anzeichen von Verstopfung zeigt.

Das elektrokinetische Modell ist darüber hinaus in der Lage Erklärungsansätze für weitere anatomische wie physiologische Eigenschaften der Niere zu liefern, die der Wissenschaft bisher noch Rätsel aufgeben. Dabei gehen seine grundsätzlichen Implikationen über die Niere hinaus und haben die Fähigkeit, das derzeitige Verständnis von filternden Kapillaren im gesamten Organismus zu verändern.

1.2.2 Konsequenzen für die glomeruläre Filtration

Das von Hausmann und Möller vorgebrachte elektrokinetische Modell trägt in drei wesentlichen Aspekten zum besseren Verständnis der glomerulären Filtrationsbarriere bei:

• Anti-Verstopfungsmechanismus

Wie bereits in Kap. 1.2.1 erläutert, beeinflusst nach der Modellvorstellung das Strömungspotential die Passage von geladenen Makromolekülen durch den Filter. Da das Potential in der Bowmanschen Kapsel negative Werte annimmt, würden negativ geladene Moleküle aus dem Filter heraus in Richtung Endothel befördert. Demgegenüber wären positiv geladene Moleküle einer elektrophoretischen Kraft in Richtung Bowmanscher Kapsel ausgesetzt. Auf ungeladene Plasmabestandteile hätte das elektrische Potential folglich keinen relevanten Einfluss (Abb. 1.8).

Auf diese Weise beschreibt das Modell elegant, wie der Filter mit der gigantischen Belastung von mehreren hundert Tonnen Proteinen im Laufe eines Menschenlebens umgeht: Sie werden entweder in den Primärharn befördert, wenn sie positiv geladen sind, oder gelangen zurück in den renalen Blutstrom, wenn sie negative Ladung tragen (wie Albumin). Der relativ geringe Anteil an Plasmaproteinen, die elektrisch neutrale Eigenschaften besitzen, könnte per Endozytose von den Podozyten und/oder Endothelzellen aus dem Filter entfernt werden.

Anti-Verstopfungsmechanismus

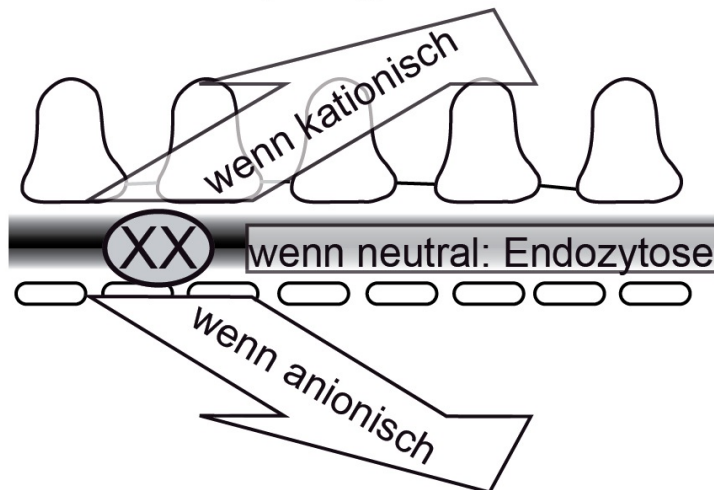


Abbildung 1.8: Anti-Verstopfungsmechanismus

Makromoleküle werden ladungsabhängig aus dem Filter entfernt: anionische Moleküle werden elektrophoretisch in Richtung Endothel, kationische Moleküle mittels Diffusion, Konvektion und Elektrophorese in Richtung Primärharn befördert. Podozyten (und Endothel) nehmen ungeladene Moleküle auf; verändert nach [Moeller & Tenten, 2013].

• Hämodynamik

Nach Hausmanns und Moellers Vorstellung liefert das elektrokinetische Modell darüber hinaus einen Erklärungsansatz, weshalb der renale Perfusionsdruck - und damit die glomeruläre Filtrationsrate - über weite Bereiche derart eng reguliert wird [Hausmann et al., 2010, Moeller & Tenten, 2013]. Ein Abfall der GFR würde das elektrische Feld in kürzester Zeit zusammenbrechen lassen und damit die Permeabilität des Filters für Albumin schlagartig erhöhen. Einen eindrucksvollen möglichen Beleg für diese Überlegung könnte die sog. *orthostatische Proteinurie* [Robinson et al., 1963] darstellen. Bei Patienten, die an dieser benignen Erkrankung leiden, kommt es nach längerem Verweilen in aufrechter Haltung zu einer Proteinurie im Bereich von etwa 1 g/d. Dabei ist ein temporärer Abfall der GFR experimentell nachgewiesen - und nach Modellvorstellung folglich mit erhöhter Permeabilität für Albumin verbunden.

• Anatomie

Als dritten wesentlichen Aspekt lässt das elektrokinetische Modell eine neue Interpretation der Glomerulanatomie zu. Im gesunden Glomerulus flottieren die Podozyten-Zellkörper relativ frei im Primärharn, während ihre (Sekundär-) Fortsätze an der Bildung des Filters beteiligt sind (Abb. 1.9 A) [Haraldsson et al., 2008]. Erst im Rahmen von pathologischen Veränderungen verlieren die Zellkörper ihren Abstand zur GFB und kommen dabei auf ihr zu liegen. Bisher ging man davon aus, dass dieser anatomische Aufbau primär der Oberflächenvergrößerung der Filtrationsbarriere diene [Neal et al., 2007]. Unter Berücksichtigung elektrokinetischer Effekte wäre jedoch auch ein anderer Grund

denkbar. Denn, um das elektrische Potential über dem Filter aufrechtzuerhalten, bedarf es einer gleichmäßigen Filtration über möglichst allen Glomerulusabschnitten. Wären die Zellkörper der Podozyten dem Filter unmittelbar angelagert, so würde dies die Ausbildung des Potentials durch die lokal geminderte Filtration erschweren oder - schwerwiegender noch - eine 'Kurzschlussverbindung' über dem Filter entstehen und das Potential vollständig zusammenbrechen (Abb. 1.9 B).

Diese Vorstellung könnte daher unter anderem auch eine pathophysiologische Erklärung der *Minimal-Change-Glomerulonephritis* liefern, einer Erkrankung, die mit einer nephrotischen Proteinurie (>3,5 g/d) einhergeht und als einziges histopathologisches Merkmal das Verstreichen der Podozytenfortsätze zeigt [Mason & Hoyer, 2010]. Der Verlust der Podozytenstruktur verhindert - nach Modellvorstellung - eine gleichmäßige Filtration über die Barriere und das elektrische Potential könnte nicht mehr suffizient aufgebaut werden. Auf diese Weise wäre über elektrisch leitende, aber nicht filtrierende Filterabschnitte die oben skizzierte 'Kurzschlussverbindung' geschaffen, über die getrennte Ladungen zurückfließen könnten (Abb. 1.9 C). Gemeinsame Folge dieser Veränderungen am Filter wäre die ausgeprägte Proteinurie.

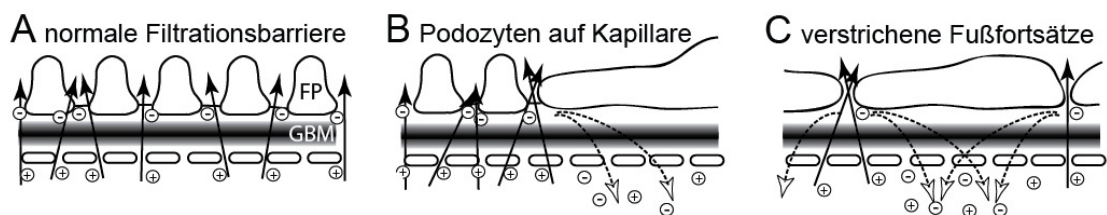


Abbildung 1.9: Einfluss der Podozyten-Anatomie auf das Strömungspotential

A Stehen nur die (intakten) Podozyten-Sekundärfortsätze in Kontakt mit der GBM, kann sich das Potential durch homogene Filtration aufbauen. Liegen jedoch die Podozyten-Zellkörper der GBM auf (B) oder sind ihre Fußfortsätze verstrichen (Minimal-Change-Glomerulonephritis, (C)), ist die Potentialentstehung erschwert und getrennte Ladung kann über die nicht-filtrierenden Abschnitte zurückfließen (gestrichelte Pfeile in B und C); verändert nach [Hausmann et al., 2010].

1.2.3 Systemische Implikationen

Hausmann und Moeller gehen in ihren Schlüssen aus dem elektrokinetischen Modell weit über die Vorgänge im Glomerulus hinaus. Gemäß ihren Vorstellungen ließen sich die Beobachtungen am Glomerulus potentiell auf *alle filtrierenden Kapillaren* des menschlichen Organismus übertragen: angefangen beim Lymphsystem bis hin zur Blut-Hirn-Schranke könnten überall filtrationsabhängige Potentiale eine Rolle spielen. So wäre das Modell zum Beispiel in der Lage zu erklären, weshalb die Proteinkonzentration der interstitiellen Flüssigkeit lediglich ca. 1/3 der Konzentration im Serum beträgt. Ein im Kapillarbett über dem fenestrierten Endothel erzeugtes Strömungspotential könnte auch hier geladene

Plasmaproteine im Kapillarlumen zurückhalten - wenn auch der Effekt weniger stark ausgeprägt wäre als im Glomerulus. Ähnlich könnte es sich mit der Blut-Liquor-Schranke verhalten, wo der Plexus Choroideus jeden Tag rund einen halben Liter proteinarmen Liquor erzeugt (durchschnittlicher Proteingehalt etwa 150-600 mg/L bzw. rund 1 % der Serumkonzentration [Burtis et al., 2006]). In diesem Kontext sind die Erkenntnisse von Kobessho et al. bemerkenswert, die zeigen konnten, dass die Proteinkonzentration im Liquor langjähriger Diabetespatienten signifikant erhöht ist [Kobessho et al., 2008]. Erhöhte Proteinpermeabilität ließe sich folglich als genereller Defekt aller filtrierenden Kapillaren im menschlichen Körper interpretieren, deren Strömungspotential nicht mehr adäquat aufgebaut wird. Auf diese Weise wäre das elektrokinetische Modell in der Lage, einen kausalen Zusammenhang zwischen Proteinurie und kardiovaskulärem Risiko herzustellen und die seit Jahren bekannte epidemiologische Korrelation [Matsushita et al., 2010] nun auch pathophysiologisch zu untermauern.

2 Zielsetzung

Bisher ist der Einfluss der beschriebenen elektrokinetischen Phänomene auf die Funktion des glomerulären Filters hypothetisch. Mit der vorliegenden Arbeit soll der Effekt des Strömungspotentials auf den Filter nun erstmals nachgewiesen werden. Dieser Nachweis soll indirekt durch *Manipulation des intrinsischen elektrischen Feldes* der Niere von außen gelingen. Im Tierversuch an der Ratte soll zu diesem Zweck eine operative Methode etabliert werden, die es ermöglicht, ein definiertes elektrisches *Gegenfeld* unmittelbar im Organ zu erzeugen (Abb. 2.1). Mit Hilfe dieses Gegenfeldes ist beabsichtigt das intrinsische elektrische Feld der Niere zu stören. Der beobachtete Effekt dieser Manipulation auf die Filtereigenschaften der Niere ließe in der Folge Rückschlüsse auf die Bedeutung des intrinsischen elektrischen Feldes selbst zu.

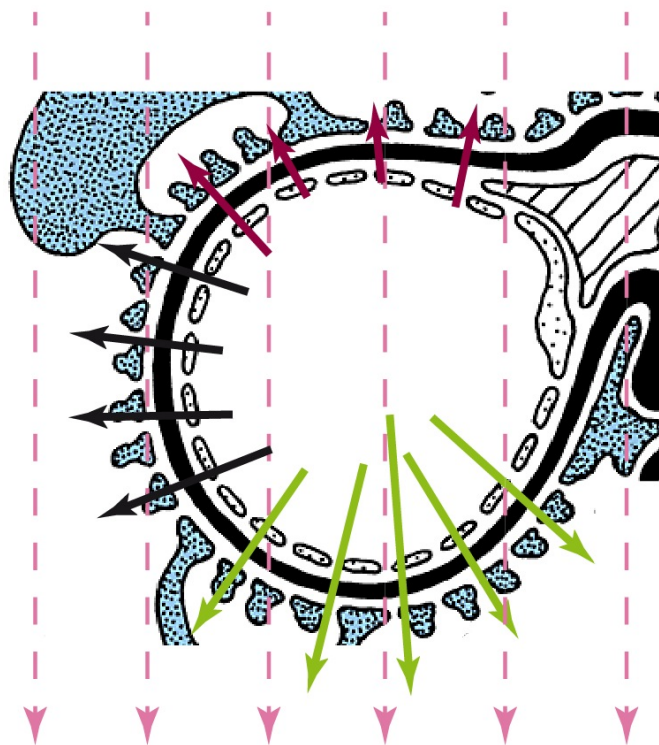


Abbildung 2.1: Filternde Kapillare im elektrischen Feld

Das extrinsische Feld durchdringt die Kapillare von oben nach unten (rosa Pfeile). Das intrinsische Feld im oberen Abschnitt der Kapillare (weinrote Pfeile) wird abgeschwächt → vermehrte Proteinurie; das Feld im unteren Abschnitt (grüne Pfeile) wird verstärkt → geringere Proteinurie; das Feld in den lateralen Abschnitten (schwarze Pfeile) bleibt unbeeinflusst; verändert nach M. Moeller.

Um das beschriebene elektrische Gegenfeld in der Niere aufzubauen, sollen im Versuch verschiedene Elektroden operativ direkt auf das Organ aufgebracht werden. Dies wird notwendig, da sich der Körper von Säugetieren im elektrischen Feld ähnlich einem *Faradayschen Käfig* verhält. Er stellt eine geschlossene Hülle mit vergleichsweise hoher elektrischer Leitfähigkeit dar, die als elektrische Abschirmung fungiert. Durch elektrische Ladungsverschiebungen an der Oberfläche bliebe das Innere des Körpers praktisch feldfrei bzw. würde in nur sehr geringem Maße von elektrischen Feldern durchdrungen. Nach Anlage einer *Gleichspannung* von 1-2 Volt an die Elektroden würden diese dann als Kondensatorplatten wirken, zwischen denen sich ein elektrisches Feld in der Niere aufbauen könnte (rosa Pfeile in Abb. 2.1). In der Folge sollte über einem Teil der filtrierenden Kapillaren das intrinsische Feld durch das extrinsische *abgeschwächt* werden (weinrote Pfeile in Abb. 2.1). Da Konvektion und Diffusion weiter auf die Albuminmoleküle einwirken, die Elektrophorese jedoch vermindert ist, hätte dies einen *erhöhten Siebkoeffizienten für Albumin* zur Folge.

Als Kontrollversuch soll über der Niere eine *Wechselspannung* gleicher Höhe angelegt werden. Diese kann ein elektrisches Feld erzeugen, welches seine Polarität mit rund 100.000 Hz wechselt - ein Vielfaches schneller als die Zeit, die Albumin zur Passage des Filters benötigt (ca. 0,2 Sekunden). Obwohl also die gleiche Energiemenge in die Niere eingebracht wird, sollten die Albuminmoleküle in diesem exogenen elektrischen Feld lediglich um eine Position *oszillieren*, während das endogene Feld (und damit auch dessen elektrophoretischer Effekt auf die Albuminmoleküle!) erhalten bliebe. Folglich wären dann in der Wechselstrom-Kontrolle annähernd physiologische Albuminkonzentrationen im Urin zu erwarten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsmaterial

3.1.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden mit männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden von Charles-River Deutschland käuflich erworben und wiesen bei Operation ein Körpergewicht von 200 bis 300 Gramm auf. Sie erhielten bis unmittelbar vor der Operation Wasser und Trockenfutter. Haltung und Betreuung der Versuchstiere erfolgten durch das Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen.



Abbildung 3.1: Wistar-Ratte

Alle Versuche erfolgten mit männlichen Wistar-Ratten von Charles-River Deutschland.
(© National Cancer Institute)

3.1.2 Elektrotechnisches Material

Zur Erzeugung der Wechselspannung wurde ein Funktionsgenerator (Firma Wavetek) verwendet. Die mit diesem Gerät erzeugte Spannung wurde mit Hilfe eines Oszilloskops (Tektronix TDS 210) überprüft (Abb. 3.2). Zur Bereitstellung der benötigten Gleichspannung kam eine Spannungsquelle der Marke dataTec zum Einsatz (Abb. 3.2).

Ein Multimeter der Marke Conrad (Modell Voltcraft VC150) sowie ein auf einer Platine verlöteter ohmscher Widerstand ('Shuntwiderstand') von $10,2 \Omega$ dienten dazu, die angelegten Spannungen, Stromstärken sowie Widerstände zu überprüfen bzw. zu bestimmen. Zur Verbindung der Komponenten wurden isolierte Kabel mit Steckkontakten benutzt, mit Kontaktklemmen versehen und - wenn nötig - gegen Kurzschluss mit zusätzlichem Isolierfilm ummantelt.



Abbildung 3.2: Spannungsquellen und Oszilloskop

Mit ihnen wurden im Versuch die Gleichspannung (rechts) bzw. Wechselspannung (links) für das elektrische Feld erzeugt. Das Oszilloskop (links oben) diente zur Kontrolle der per Funktionsgenerator erzeugten Wechselspannung.

Zur Herstellung der Elektroden für den Versuchsaufbau mit der evertierten Niere 'im Löffel' (Kap. 3.2.3) fand Aluminiumfolie mit 0,015 mm Stärke Verwendung. Diese wurde mittels Silberlack mit Metalldrähten leitend verbunden. Im Anschluss wurde die untere Elektrode in eine Halterung aus Plexiglas (den 'Löffel') eingepasst, die im Experiment die Niere aufnahm (Abb. 3.3).

Die Elektroden für den Versuchsaufbau mit der Niere 'in situ' (Kap. 3.2.4) wurden aus unbeschichtetem Kupfergeflecht hergestellt (Abb. 3.4). Dieses Geflecht der Firma GKD, Düren, wies eine Maschenweite von 0,458 mm und einen Drahtdurchmesser von 0,05 mm auf. Daran wurden mit Lötzinn Kupferdrähte befestigt, die durch eine Lackschicht elektrisch isoliert waren.

3.1.3 Operationsmaterial

Die Eingriffe wurden zunächst auf einem manuell beheizbaren OP-Tisch durchgeführt. Dabei diente ein digitales Thermometer der Marke RS dem Erfassen einer möglichen Hypo- bzw. Hyperthermie während der Operation.



Abbildung 3.3: Plexiglashalterung mit Elektrode

‘Löffel’ verschiedener Größen, in welche die Niere im evertierten Versuchsaufbau platziert wurde. Links ist die untere Elektrode bereits in den Boden eingelassen.

Im weiteren Verlauf der Versuchsserie kam ein ebenfalls beheizbarer OP-Tisch der Marke Harvard Apparatus (Modell 872H und Controller 874) zum Einsatz. Dieser OP-Tisch war mit einer rektalen Temperatursonde ausgestattet, die eine an die Kerntemperatur des Versuchstieres angepasste Thermoregulation des Tisches möglich machte. Eine Rotlichtlampe (150 W, Marke Philips) stabilisierte zusätzlich die Körpertemperatur während und nach den Versuchen.

Für Eingriffe in Inhalationsnarkose mit Isoflurane (S. 21) fand das FLUOVAC-Anästhesiesystem mit Vaporisator, Anästhesie-Box und Gas-Evakuationsanlage von Harvard Apparatus Verwendung. Mit diesem wurden verabreichte Sauerstoffmenge und Narkosegaskonzentration reguliert sowie die Abluft abgesaugt. Die Anästhesie-Box diente dabei zur Einleitung der Narkose. Als Frischluft kam reiner Sauerstoff der Firma Linde-Gas zum Einsatz, der dem Vaporisator aus einer Hochdruckflasche zugeführt wurde.

Der Blutdruck wurde invasiv von einem Carotis-Katheter registriert und über einen Druckaufnehmer (Modell APT300) an ein Übertragungs- und Amplifikations-Modul (Modell TAM-D) übertragen (beides Harvard Apparatus/Hugo Sachs Elektronik). Unter Verwendung des Programms HSE-BDAS in der Version 1.1.1.202 (32) (Hugo Sachs Elektronik) wurden die gewonnenen Daten registriert und ausgewertet.

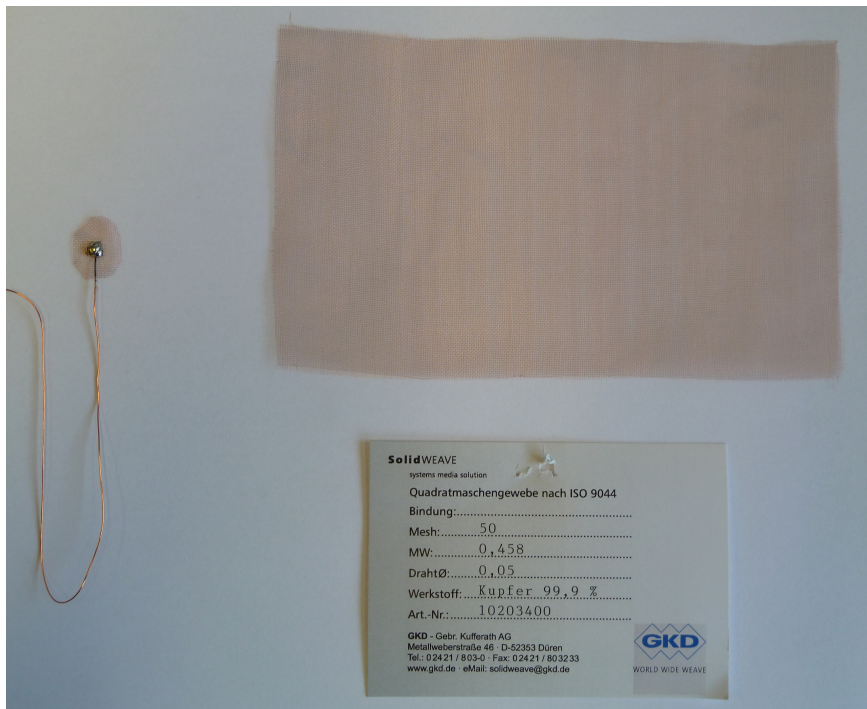


Abbildung 3.4: Kupfergewebe und Elektrode

Das unbeschichtete Kupfergeflecht (oben) wurde mittels Lötzinn elektrisch leitend mit den Elektrodendrähten verbunden, deren transparente Lackisolierung zuvor an der Spitze verdampft; fertige Elektrode links.

Die i.v. Applikation von Volumenersatz und Medikamenten erfolgte mit Hilfe des BBraun Perfusors Modell Secura F. Ein weiterer Perfusor der Marke BBraun, Modell Perfusor fm, wurde dazu genutzt, den Carotis-Katheter sowie den Druckaufnehmer bei invasiver Blutdruckmessung zu befüllen und nötigenfalls von rückläufigem arteriellem Blut zu befreien.

Die Lagerung der Niere ‘im Löffel’ während des Versuches erfolgte in Agarose vom Typ peqGOLD Universal-Agarose (Fa. Peqlab Biotechnologie). Diese wurde in einer Konzentration von 1 % (w/v) entweder in isotoner NaCl- Lösung (0,9 %) oder in aqua bidestillata (Bidest) angesetzt und aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach anschließendem Abkühlen auf $< 37^{\circ}\text{C}$ konnte sie verwendet werden. Zur Befestigung der angefertigten Kupferelektroden an das Organ im Versuchsaufbau mit der Niere ‘in situ’ kam der Hautkleber Dermabond[®] (2-Octyl Cyanoacrylate) der Marke Ethicon zum Einsatz.

Für zentralvenöse Zugänge sowie zur Kanülierung von Ureteren wurden individuell Katheter aus einem Polyethylen-Schlauch (Außen-/Innendurchmesser 4,2 / 3,1 mm) gefertigt. Durch Erhitzung des Materials über einem Bunsenbrenner konnten an die jeweiligen anatomischen Verhältnisse angepasste Kathetergrößen hergestellt werden. Für die invasive Blutdruckmessung in der A. carotis (Kap. 3.2.2) fand ein Silikonschlauch mit 1,7 mm Innendurchmesser Verwendung, welcher mit einer abgestumpften Hohnadel (20 G) versehen war, um sicheres wie atraumatisches Einbringen in die Arterie zu ermöglichen.

3.1.4 Medikamente

Die folgende Pharmaka kamen bei den Versuchen zur Anwendung:

Anästhesie/Analgesie

Ketamin - fand allein oder in der Kombination mit Xylazin als Injektionsnarkose Verwendung. In der Regel erfolgte die Narkose-Einleitung mit intraperitonealer Applikation von $40 \frac{mg}{kgKG}$ Ketamin und $1-2 \frac{mg}{kgKG}$ Xylazin [Wijnbergen, 2005]. Im weiteren OP-Verlauf wurde Ketamin dann ohne Xylazin direkt auf die Leber aufgetragen. Dabei wurden in festen Intervallen von 20 Minuten jeweils $10 \frac{mg}{kgKG}$ Ketamin appliziert. Gleichzeitig wurde das Tier regelmäßig auf Schmerzreize untersucht und die Narkosegabe daran angepasst. Alternativ wurde Ketamin i.v. per Perfusor verabreicht, um möglichst konstante Wirkspiegel zu erreichen. Mit einer ungefähren Halbwertszeit von 60 min [Plumb, 1999] wurden $15-20 \frac{mg}{kgKG}$ pro Stunde infundiert [Morrissey & Carpenter, 2004].

Xylazin - ein α_2 -Agonist, wurde ausschließlich in fixer Kombination mit Ketamin verwendet (s.o.). Es diente zur Narkose-Einleitung wegen seiner analgetischen, sedativen, aber auch muskelrelaxierenden Wirkung [Me, 2001].

Medetomidin - ebenfalls ein α_2 -Agonist, kam als Ersatz für Xylazin in Kombination mit Ketamin zum Einsatz. Es wurde in Dosierungen von $0,5 \frac{mg}{kgKG}$ zusammen mit $60 \frac{mg}{kgKG}$ Ketamin [Wijnbergen, 2005] zur Einleitung verwendet. Der Vorteil bei Medetomidin lag in einer 10-fach höhere Selektivität für α_2 -Rezeptoren als für α_1 -Rezeptoren im Vergleich zu Xylazin [Virtanen et al., 1988]. Dadurch war eine geringere - unerwünschte - Vasokonstriktion als durch Xylazin zu erwarten [Tranquilli et al., 1984].

Pentobarbital - ein GABA-Agonist aus der Gruppe der Barbiturate. Es wurde in Kombination mit Fentanyl ebenfalls zur Injektionsnarkose verwendet. Zur Anästhesie-Einleitung erfolgte die i.p. Gabe von $30 - 45 \frac{mg}{kgKG}$ Pentobarbital [Morrissey & Carpenter, 2004] zusammen mit $5 \frac{\mu g}{kgKG}$ Fentanyl.

Fentanyl - ein hochpotentes Opioid. Es wurde ausschließlich in Kombination mit Pentobarbital (s.o.) oder Isoflurane zur Narkose verwendet. Die Applikation als analgetische Narkosekomponente erfolgte s.c. in einer Dosierung von $5 \frac{\mu g}{kgKG}$.

Isoflurane - ein Inhalationsanästhetikum aus der Gruppe der halogenierten Kohlenwasserstoffe. Es kam in Kombination mit Fentanyl zum Einsatz. Die Narkose-Einleitung erfolgte mit 3-4 Vol.-% Isoflurane bei einem Sauerstofffluss von 1000 ml/min [Boussarie, 2001]. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde die Isoflurane-Konzentration während des Eingriffs auf 1-2 Vol.-%, der Sauerstofffluss auf 300-400 ml/min reduziert.

Sonstige Pharmaka

Adrenalin - ein Sympathomimetikum aus der Gruppe der Katecholamine. Es fand Verwendung bei der Überprüfung der invasiven Blutdruckmessung (Kap. 3.2.2) und Kreislaufantwort der Versuchstiere. Dazu wurden bei einigen Versuchstieren 0,001-0,002 $\frac{mg}{kgKG}$ Adrenalin i.v. verabreicht [Morrisey & Carpenter, 2004].

Heparin - ein Antikoagulanz aus der Gruppe der Glykosaminoglykane. Das Medikament war ebenfalls im Kontext der invasiven Blutdruckmessung erforderlich. Hier wirkte es der Bildung von Thromben im Carotis-Katheter entgegen. Dazu wurden der NaCl-Lösung im Katheter 500 I.E. Heparin pro 10 ml NaCl beigemischt.

Furosemid - ein Diuretikum aus der Gruppe der Schleifendiuretika. Das Pharmakon diente der Steigerung der Urinproduktion in beiden Versuchsvarianten (Kap. 3.2.3 und Kap. 3.2.4). Es wurde in einem i.v.-Bolus von 1 $\frac{mg}{kgKG}$ verabreicht.

Octenidin - ein Antiseptikum. Dieses kam bei der präoperativen Hautdesinfektion der Versuchstiere zur Anwendung.

3.2 Versuchsaufbau und -durchführung

3.2.1 Elektrotechnischer Aufbau

Die nachfolgenden Schaltpläne verdeutlichen den elektrotechnischen Aufbau des in Kap. 3.1.2 beschriebenen Materials. Wie in Abb. 3.5 gezeigt, waren bei Messungen mit Wechselspannung das Oszilloskop und der Shuntwiderstand parallel angeordnet, um anliegende Spannung und Stromfluss ablesen bzw. berechnen zu können. Im Gegensatz dazu konnten bei Gleichstrom-Messungen sowohl die abfallende Spannung wie auch der Stromfluss direkt mit dem Multimeter erfasst werden (Abb. 3.6). Details zu den elektrotechnischen Hintergründen und Berechnungen sind Kap. 3.3.1 zu entnehmen.

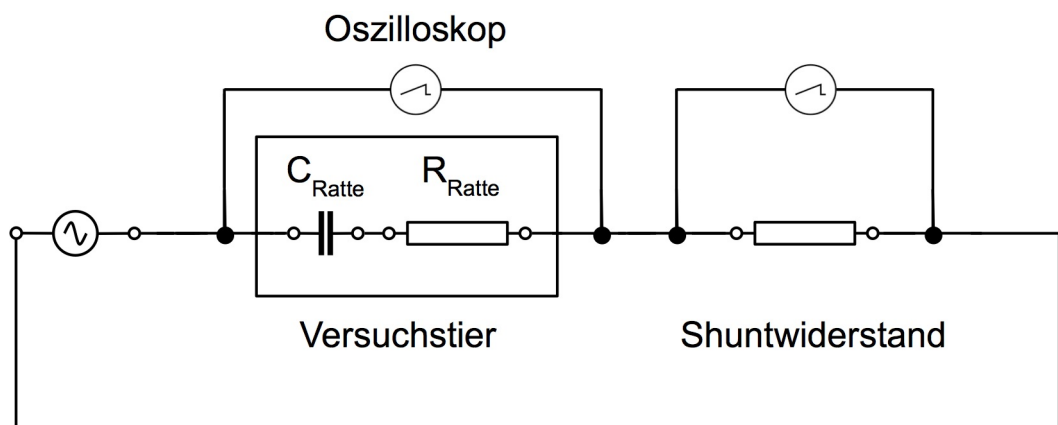


Abbildung 3.5: Schaltplan Wechselstrom

An die Elektroden des Versuchstieres wird Wechselspannung angelegt; der Gesamtwiderstand setzt sich zusammen aus kapazitärem Widerstand (C_{Ratte}) und resistivem Widerstand (R_{Ratte}); direktes Messen der angelegten Wechselspannung mittels Oszilloskop; indirekte (rechnerische) Bestimmung des Stromflusses durch gemessenen Spannungsabfall über bekanntem Shuntwiderstand.

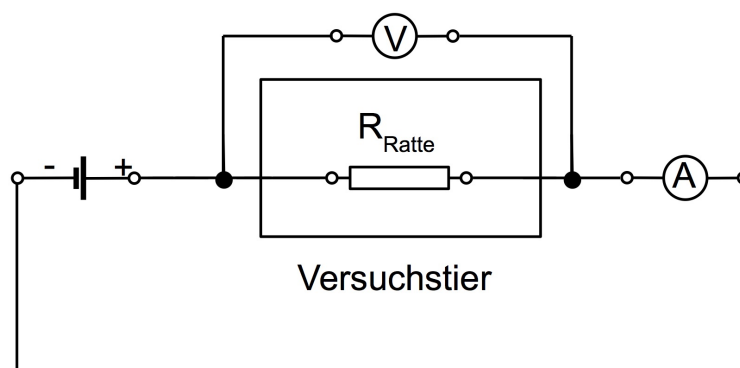


Abbildung 3.6: Schaltplan Gleichstrom

An die Elektroden des Versuchstieres wird Gleichspannung angelegt; der Gesamtwiderstand entspricht dem resistiven Widerstand (R_{Ratte}); direkte Messung der Gleichspannung mittels Voltmeter (Parallelschaltung) bzw. Strommessung durch Amperemeter (Reihenschaltung).

3.2.2 Grundlegende OP-Techniken

Nachfolgend sollen alle diejenigen OP-Techniken erläutert werden, welche bei beiden Versuchsaufbauten Anwendung fanden. Auf sie wird bei der anschließenden Beschreibung der unterschiedlichen Varianten Bezug genommen.

OP-Vorbereitungen und -Einleitung

Zunächst wurde das Versuchstier gewogen und das Narkosemittel gewichtsadaptiert vorbereitet. Erfolgte der Eingriff in intraperitonealer Anästhesie, wurde anschließend das Narkosegemisch in adäquater Dosierung (Kap. 3.1.4) in die Bauchhöhle injiziert. Eingriffe in Inhalationsnarkose mit Isoflurane wurden in der dafür vorgesehenen Box eingeleitet und nachfolgend Fentanyl zur Analgesie verabreicht. Daraufhin wurden Hals, Abdomen und ggfs. Leisten des Tieres mit einem elektrischen Rasierer geschoren, um ungestörtes Operieren zu gewährleisten, sowie der Operationsbereich großzügig mit Octenidin-Desinfektionsmittel abgewaschen. Als Nächstes wurde das Versuchstier auf dem beheizbaren Operationstisch fixiert und die Temperatursonde rektal 2-3 cm tief eingeführt. Als Soll-Wert für die Körperkerntemperatur des Tieres wurden 37,5° Celsius festgesetzt. Abb. 4.1 auf S. 34 zeigt den typischen OP-Aufbau in der Gesamtschau am Beispiel einer Injektionsnarkose.

ZVK-Anlage V. jugularis

Der zentralvenöse Katheter am Hals stellte die primäre Methode zur Volumen- und Medikamentenapplikation während des Eingriffes dar. Dazu wurde der Hals zunächst medio-lateral zwischen Jugulum und Mandibula inzidiert. Durch stumpfe Präparation des darunter liegenden subcutanen Fettgewebes und oberflächlicher Schichten der Halsfaszie konnte anschließend die V. jugularis interna (im Übergang zur V. brachiocephalica) freigelegt werden. Alternativ war auch ein ähnlich kaliberstarkes zuführendes Gefäß zur Punktion geeignet. Dann wurde die Vene nach cranial durch Ligatur verschlossen und retrograder Blutfluss von caudal mittels Gefäßklemme unterbunden. Im Anschluss wurde das Gefäß mittels Mikroschere eröffnet und der Katheter eingeführt. Nach Lösen der Klemme konnte der Katheter in Richtung V. cava superior vorgeschoben und durch Ligatur fixiert werden. Abschließend wurde die korrekte Lage und Durchgängigkeit des Katheters durch Aspiration und Injektion überprüft.

ZVK-Anlage V. femoralis

Bei schwierigen anatomischen Verhältnissen am Hals kam als alternativer Zugangsweg der zentralvenöse Katheter in der V. femoralis in Frage. Zur Anlage wurde die Leiste bei etwa 45 Grad abduzierten Hinterläufen ca. zwei Zentimeter inzidiert. Nach stumpfer Präparation bis zur Lacuna vasorum erfolgte die Darstellung der V. femoralis bis proximal der epigastrischen Gefäße (Abb. 4.2 auf S. 34). In gleicher Technik wie bei ZVK-Anlage in

der V. jugularis wurde dann die Vene distal ligiert, proximal abgeklemmt und der Katheter unter Sicht eingeführt. Nach Fixierung im Lumen mittels Ligatur wurde die Gefäßklemme gelöst und der Katheter durch Aspiration auf Funktion geprüft. Abb. 4.3 auf S. 35 vermittelt einen Eindruck von der abschließenden operativen Situation.

Katheter-Anlage A. carotis

Bei den Versuchen konnte optional der arterielle Blutdruck des Tieres während der OP invasiv gemessen werden. Dazu diente ein weiterer Katheter, der in die A. carotis communis des Tieres eingebracht war. Zunächst wurde die Vagina carotica des Tieres durch vorsichtige Mobilisation von M. sternocleidomastoideus und prätrachealer Muskulatur freigelegt. Nach ihrer Eröffnung wurde die A. carotis behutsam langstreckig dargestellt, wobei besonders der N. vagus geschont werden musste. In gleicher Weise wie bei den zentralvenösen Zugängen in Femoral- bzw. Jugularvene wurde das Gefäß dann distal mit Ligatur verschlossen. Proximal wurde der arterielle Fluss mit einer Gefäßklemme unterbunden und zwischen Klemme und distaler Ligatur eine weitere Ligatur vorgelegt. Abb. 4.4 auf S. 36 zeigt die Situation unmittelbar vor Einbringen des Katheters. Nach Inzision der Arterie im ausgeschalteten Gefäßabschnitt wurde die stumpfe Hohladel des Katheters eingeführt und mit Ligatur druckdicht fixiert. Die Klemme wurde geöffnet, und die Druckmessung konnte erfolgen. Den gesamten Aufbau illustriert Abb. 4.5 auf S. 36.

Abdomen-Präparation

Die Präparation der Bauchwand umfasste fünf wesentliche Operationsschritte. Als Erstes erfolgte die mediane Inzision bis auf die Abdominalfaszie. Im nächsten Schritt wurden die Cutis stumpf mittels Präparierschere von der Faszie gelöst und größere Gefäße ligiert. Anschließend wurde die Bauchhöhle in einem weiteren longitudinalen Schnitt eröffnet, wobei Darmschlingen, Harnblase und vor allem die Leber zu schonen waren. Im vierten Schritt konnte die Bauchmuskulatur mittels Retraktoren nach lateral mobilisiert werden, um den Blick auf die inneren Organe freizugeben. In einigen Fällen war dazu noch die Erweiterung des OP-Feldes durch zwei transversale Inzisionen notwendig.

Abschließend musste der Darm nebst Mesenterien in der Regel nach links oder rechts neben das Versuchstier ausgelagert werden, um ausreichend Platz für die Präparation im Bauchraum bzw. Retroperitoneum zu schaffen. Der Darm wurde dann in feuchte Kompressen eingeschlagen, um ihn vor Austrocknung zu schützen. Zusätzlich verhinderte die Rotlichtlampe größeren Temperaturverlust über die regelmäßig mit NaCl-Lösung befeuchteten Darmschlingen. Ein zweiter Messfühler des Digital-Thermometers war dabei zur kontinuierlichen Kontrolle in das so mobilisierte Darmpaket eingebracht.

Anlage Ureter-Katheter

Zur verlässlichen Gewinnung von Urin-Proben mussten bei den Versuchen die Ureteren seitengetreunt kanüliert werden. Dazu wurden zunächst Dünn- und Dickdarm lateralisiert, um Sicht auf das Retroperitoneum freizugeben. Als Leitstruktur zur Auffindung des Ureters diente der M. psoas major. Anschließend konnte der Ureter von umliegendem Fett- und Bindegewebe befreit und langstreckig dargestellt werden. Das Lumen wurde mittels Schere eröffnet, der Katheter behutsam eingeführt und bis auf Höhe des pyeloureteralen Übergangs vorgeschoben. War die korrekte Lage durch Fördern von Urin bestätigt, konnte der Katheter per Ligatur im Ureter fixiert werden. Abb. 4.8 auf S. 38 illustriert die Situation im Abdominalsitus unmittelbar nach Fixierung des rechten Katheters.

3.2.3 Versuchsvariante mit evertierter Niere ‘im Löffel’

Nach Einleitung der Narkose, wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, erfolgte zunächst die Präparation am Hals bzw. der Leiste zur Anlage eines zentralvenösen Zugangs. Sobald dies durchgeführt war, konnte intravenöse Volumensubstitution mit isotonischer NaCl-Lösung beginnen, um Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung und Blutung beim Eingriff zu kompensieren. Dabei wurden im Regelfall 5 ml/kg KG pro Stunde infundiert.

Im nächsten Schritt wurde die Bauchhöhle eröffnet, um Zugang zu Nieren und Ureteren zu erhalten. Die Darmschlingen wurden nach links neben das Tier mobilisiert und ein Katheter in den rechten Ureter des Versuchstieres eingeführt. Anschließend konnte mit der Präparation der linken Niere begonnen werden. Um das Organ in der löffelartigen Plexiglashalterung (Abb. 3.3, S. 19) platzieren zu können, war es wichtig, es sauber von allen umliegenden Strukturen zu lösen. Insbesondere mussten bei der Präparation die in der Capsula Adiposa eingebettete Nebenniere sowie die in enger anatomischer Beziehung zur Niere stehenden Milzgefäße geschont werden. In Abb. 4.6 auf S. 37 ist dieser Schritt zu einem frühen Zeitpunkt erfasst. War die Niere vollständig dargestellt, konnte sie behutsam in den ‘Löffel’ mobilisiert werden, dessen Boden von - mit NaCl hergestellter - Agarose ausgefüllt worden war. Dabei war stets sicherzustellen, dass es weder zu arterieller noch venöser Beeinträchtigung der Blutzirkulation der Niere ‘im Löffel’ kam (erkennbar an weißlicher bzw. dunkelblauer Verfärbung der Organoberfläche).

Anschließend kam die mit destilliertem Wasser angesetzte Agarose zum Einsatz, mit der ein elektrisch *isolierender* Ring um die Niere ‘im Löffel’ gegossen wurde. War dieser ausgehärtet, konnte im nächsten Schritt die zweite Elektrode auf der Oberseite der Niere aufgebracht werden; erneut wurde dazu die NaCl-Agarose verwendet. Sie stellte eine elektrisch *leitende* Verbindung zwischen Nierenoberseite und Elektrode her. Dieser Aufbau ist schematisch in Abb. 3.7 zusammengefasst. Als Nächstes wurden auch der linke Ureter mit einem Katheter versehen und schließlich beide Elektroden, wie im Kap. 3.2.1 beschrieben, verkabelt. Damit waren die operativen Vorbereitungen abgeschlossen, und die Messungen konnten beginnen. Abb. 4.9 auf S. 39 zeigt die abschließende Situation.

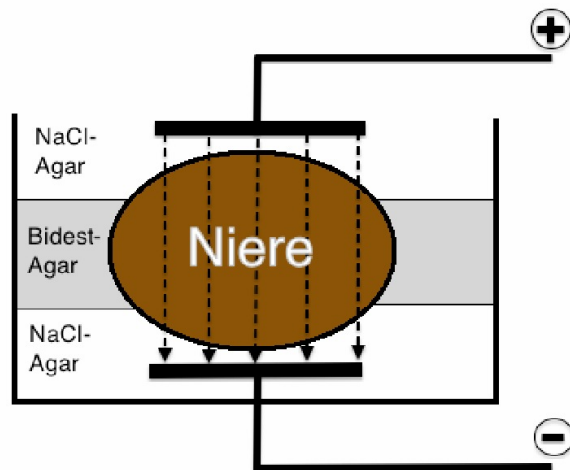


Abbildung 3.7: Schema Niere ‘im Löffel’

Die Niere ist im Plexiglashalter von Agarose-Gel ummantelt. Boden und Decke sind mit leitender NaCl-Agarose ausgefüllt und stellen Kontakt zu den Elektroden her. Dazwischen ist ein zusätzlicher Ring Bidest-Agarose zur elektrischen Isolierung platziert. Durch Anlegen einer Spannungsdifferenz zwischen den Elektroden entsteht ein elektrisches Feld, das die Niere durchdringt (gestrichelte Pfeile).

Zu Beginn der Messreihe wurden dann $1 \frac{mg}{kgKG}$ Furosemid zusammen mit 1 ml NaCl als Bolus infundiert, um die Diurese des Versuchstieres zu steigern. In der sich anschließenden Äquilibrierungsphase wurde Urin seitengetreunt zur Ermittlung eines Basalwertes gesammelt. Es folgten dann Serien mit jeweils 15-minütiger Applikation von Wechsel- und Gleichstrom, in denen Urin seitengetreunt von rechter und linker Niere asserviert wurde. Abschließend wurden für weitere 15 Minuten Proben gesammelt, ohne dass eine Spannung über der Niere anlag.

Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über das Messprotokoll im Versuch.

Tabelle 3.1: Messprotokoll im Versuch

Beschreibung	Zeit	Bezeichnung
Versuchsbeginn	0 - 15. min	‘kein Strom’
Wechselstrom-Applikation	16. - 30. min	‘Wechselstrom’
Gleichstrom-Applikation	31. - 45. min	‘Gleichstrom’
15 min nach Gleichstrom	46. - 60. min	‘+15 min’

Nach Abschluss der Messungen wurde das Tier per Kardiotomie euthanasiert.

3.2.4 Versuchsvariante mit Niere ‘in situ’

Der Aufbau in dieser Variante glich in weiten Teilen dem in Kap. 3.2.3 beschriebenen Versuch. Die Plexiglas-Halterung, in der die Niere in der ersten Variante platziert wurde, um das elektrische Feld zu applizieren, fand in diesem Aufbau jedoch keine Verwendung. Stattdessen kamen die in Kap. 3.1.2 beschriebenen Kupferelektroden zum Einsatz. Diese wurden mit Hilfe von Dermabond[®]-Hautkleber auf Ventral- und Dorsalseite der linken Niere aufgebracht. Wie auch in der zuvor beschriebenen Variante, musste dazu die Niere zunächst von ihrer Kapsel sowie umliegendem Fett- und Bindegewebe befreit werden. Im Gegensatz zur Plexiglas-Halterung konnte die Niere danach aber in ihrer physiologischen anatomischen Lage verbleiben. Auf diese Weise war das Organ weniger Zug- und Druckkräften ausgesetzt, was besonders das Risiko temporärer Minderperfusion reduzieren sollte. In Abb. 4.7 auf S. 38 ist der OP-Situs nach Anbringen beider Elektroden dargestellt. Der weitere Versuchsablauf entsprach der Versuchsvariante mit der evertierten Niere ‘im Löffel’ (Kap. 3.2.3).

3.3 Versuchsauswertung

3.3.1 Elektrotechnische Auswertung

Bei der elektrotechnischen Auswertung waren mehrere Parameter von Interesse, die Rückschlüsse auf die Funktionalität des Versuchsaufbaus und dabei insbesondere auf die Eigenschaften des elektrischen Feldes zuließen:

Spannung

Die über der Niere zwischen den beiden Elektroden angelegte Spannung stellte die wichtigste Determinante des elektrischen Feldes dar. Bei den Messungen mit Gleichspannung konnte diese relativ leicht bestimmt werden. Hier musste lediglich das Multimeter als Voltmeter parallel in den Stromkreis eingebracht werden, um die abfallende Spannung direkt messen zu können.

Im Gegensatz dazu war dies bei den Messreihen in Wechselspannung nicht ohne Weiteres möglich. Da die Spannung ihre Polung mit einer Frequenz von 100 kHz wechselte, vermochte ein Voltmeter diese nicht direkt zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde die generierte Rechteckspannung auf dem Oszilloskop dargestellt und konnte dann manuell als Amplitude des Signals abgelesen werden.

Stromstärke

Der Stromfluss über die Niere diente im Versuch als Nachweis dafür, dass - intakte Isolierung der Drähte vorausgesetzt - zwischen den Elektroden eine leitende Verbindung bestand. Wie schon bei der Spannung, war auch die Messung der Stromstärke bei Gleichspannung einfacher zu realisieren als bei Wechselspannung. Bei ersterer bedurfte es wiederum lediglich des Multimeters. Dieses wurde als Amperemeter in Reihe geschaltet und zeigte den Stromfluss direkt an.

Die Bestimmung der Stromstärke bei Wechselspannung erfolgte über einen Zwischenschritt: hier wurde ein bekannter ohmscher Widerstand von $10,2 \Omega$ als sog. *Shuntwiderstand* in Reihe in den Stromkreis geschaltet. Über diesem Widerstand wurde dann die abfallende Spannung mittels Oszilloskop abgelesen. Mit bekanntem Widerstand R und abgelesener Spannung U ließ sich der Strom I nach dem Ohmschen Gesetz berechnen als $R = \frac{U}{I} \Leftrightarrow I = \frac{U}{R}$.

Widerstand

Der elektrische Widerstand eines Stromkreises kann bei Gebrauch von Gleichstrom synonym verwendet werden mit dem Begriff des *ohmschen* oder *resistiven* Widerstandes. Dieser ist definiert als Verhältnis R von angelegter Spannung U (in Volt) und Stromstärke I (in Ampere). Demgegenüber muss bei Verwendung von Wechselstrom grundsätzlich neben diesem (reellen) *Wirkwiderstand* auch ein (imaginärer) *Blindwiderstand* beachtet werden, der bei Kondensatoren im Wechselstromkreis als sog. *kapazitiver*

Widerstand X_c auftritt. Dabei handelt es sich um denjenigen Widerstand, den ein Kondensator dem Wechselstrom durch das ständige Auf- und Abbauen des elektrischen Feldes entgegensetzt. Dieser ist umgekehrt proportional zu Frequenz f des Wechselstroms und Kapazität C des Kondensators und berechnet sich zu $X_c = \frac{1}{2\pi \cdot f \cdot C}$. Bei den verwendeten Frequenzen im kHz-Bereich kann davon ausgegangen werden, dass das Nierengewebe überwiegend *resistive* Eigenschaften zeigt [Schwan & Kay, 1957, Pethig, 1987]. Der *kapazitive* Widerstand wird daher im Versuch nicht weiter berücksichtigt.

Der resistive Widerstand des ‘Systems Ratte’, d.h. Elektrodendrähte mit verklebten Elektroden an der linken Niere, ließ sich auf zwei Wegen mit gleichem theoretischem Hintergrund bestimmen. Zum einen vermochte das Multimeter direkt den resistiven Widerstand zu messen. Dabei produzierte es einen definierten Stromfluss bei bekannter Spannung und konnte so auf den Widerstand rückschließen. Zum anderen war es auf gleiche Weise möglich, aus anliegender (Gleich-) Spannung und dem gemessenen Stromfluss den resistiven Widerstand des Systems selbstständig zu berechnen (s.o.).

Elektrische Eigenschaften der Agarose

Wie in Abb. 3.7 auf S. 27 zu sehen, wurde die linke Niere im Versuch z.T. in Agarose eingebettet. Diese war zum einen mit aqua bidestillata (Bidest), zum anderen mit NaCl-Lösung angesetzt worden. So sollte eine elektrisch *isolierende* (Bidest) und eine elektrisch *leitende* Gel-Matrix (NaCl) entstehen.

Die elektrischen Eigenschaften beider Gele mussten jedoch experimentell überprüft werden, da sie unter Umständen großen Einfluss auf den Aufbau des elektrischen Feldes hatten. Ein *leitfähiges Bidest-Agar* könnte dafür sorgen, dass der Strom - dem Weg des geringsten Widerstandes folgend - um die Niere *herum* flösse. Es würde also kein ausreichendes elektrisches Feld über der Niere aufgebaut. In gleicher Weise würde ein *isolierendes NaCl-Agar* die elektrische Koppelung der oberen Elektrode an die Niere erschweren und den Aufbau eines homogenen Feldes ebenfalls behindern.

Resistiver Widerstand R

Zur Bestimmung des resistiven oder ohmschen Widerstandes R (Einheit: Ω) wurden die Prüfmaterialien in eine Schutzringanordnung bekannter Abmessungen verbracht, die äußere Störungen und Leckströme verhindern sollte. Anschließend konnte der Widerstand durch Spannungsmessung bei definiertem Stromfluss bestimmt werden (s.o.). Dabei kam ein Elektrometer zum Einsatz, bei dem es sich um ein hoch-sensitives elektronisches Voltmeter mit sehr großem Eingangswiderstand ($\gg R$) handelt.

Spezifischer Widerstand ρ

Hierbei handelt es sich um eine Materialkonstante (Einheit: $\Omega \cdot m$). Sie ließ sich für die Agarose-Gele mittels bekannter Länge L und Querschnittsfläche A der Schutzringanordnung sowie des ermittelten resistiven Widerstandes R bestimmen als: $\rho = R \cdot \frac{A}{L}$

Permittivität ϵ

Sie wird auch *dielektrische Leitfähigkeit* genannt (Einheit: $\frac{F}{m}$) und bezeichnet die Durchlässigkeit eines Materials für elektrische Felder. Die relative Permittivität ϵ_r eines Materials stellt seine frequenz- und temperaturabhängige Durchlässigkeit im Verhältnis zur elektrischen Feldkonstante (des Vakuums) ϵ_0 dar: $\epsilon_r = \frac{\epsilon}{\epsilon_0}$.

Zur Bestimmung von ϵ_r wurde das Prüfmateriale zunächst wieder in einer Schutzringanordnung definierter Länge L und Querschnittsfläche A platziert. Im Anschluss konnte mittels eines sog. LCR-Meters die Kapazität C bei einer Spannung von 1 V und einer Frequenz von 100 kHz gemessen werden. Mit der so bestimmten Kapazität C war dann ein Rückschluss auf ϵ_r des Materials nach der folgenden Formel möglich:

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{A}{L} \Leftrightarrow \epsilon_r = \frac{C \cdot L}{\epsilon_0 \cdot A}; \quad \epsilon_0 \approx 8,8541 \cdot 10^{-12} \frac{As}{Vm} \quad (3.1)$$

3.3.2 Biochemische Methoden

Klinische Chemie: Urin

Im Urin wurde die Proteinkonzentration zusammen mit der Creatininkonzentration bestimmt. Die Probenanalyse erfolgte mit dem Vitros[®] 250 Chemistry System der Firma Ortho Clinical Diagnostics. Dabei wurde der quantitative Proteinnachweis mit einem kolorimetrischen Testverfahren durchgeführt und die Bestimmung der Creatininkonzentration mit Hilfe eines Zweipunkt-Kinetiktests realisiert.

Die im Urin gemessene absolute Proteinkonzentration (in mg/dl) ist erheblich abhängig von der momentanen Aktivität des Tubulussystems. Wird dem Primärfiltrat beim Durchgang durch die postglomerulären Nephronabschnitte in hohem Maße Flüssigkeit entzogen, so steigt folglich auch die Proteinkonzentration im Endharn (und umgekehrt). Creatinin wird frei im Glomerulus filtriert und nicht (bzw. kaum) rückresorbiert, sodass seine Konzentration ausreichend gut mit der aktuellen Harnkonzentrierung korreliert. Aus diesem Grund wurde die gemessene Proteinkonzentration stets in das Verhältnis zur aktuellen Creatininkonzentration gesetzt und auf 1000 $\mu\text{mol/L}$ normiert. Da die Proteinkonzentrationen darüber hinaus interindividuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren aufwiesen, wurde anschließend der Basiswert jeder Messung gleich eins gesetzt. Im Anschluss konnten die gewonnenen Proteinkonzentrationen dann im Verhältnis zum Basiswert angegeben werden. Dies ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Tieren.

$$Urin - Protein_{korr} = \frac{Urin - Protein(mg/dl)}{Basiswert(mg/dl)} \cdot \frac{1000\mu\text{mol/L}}{Creatinin(\mu\text{mol/L})} \quad (3.2)$$

SDS-Elektrophorese

Zusätzlich zum klinisch-chemischen Proteinnachweis wurden die gewonnenen Urinproben bei einem Teil der Versuchstiere ebenfalls mittels Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden die Urin-Proben im ersten Schritt anhand der zuvor bestimmten Creatininkonzentration durch Verdünnung mit aqua ad injectionem normiert. So sollte eine bessere Vergleichbarkeit des Proteinmusters im Gel ermöglicht werden, welche von der momentanen Harnkonzentration bei Probenentnahme unabhängig war. Im Anschluss wurden die Proben mittels 5-fach konzentriertem Lämmli-Probenpuffer denaturiert. Der Probenpuffer setzte sich zusammen aus 62.5 mmol Tris-HCl pH 6,8, 2 Vol.-% SDS, 10 Vol.-% Glycerol, 5 Vol.-% 2-Mercaptoethanol und 0,001 Vol.-% Bromphenolblau. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C und anschließendem Abkühlen auf Eis konnten die Proben auf das Trenngel aufgetragen werden.

Zum Einsatz kam hier ein System der Firma Invitrogen® mit vorgefertigten 15-Well Gelen des Typs NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels. NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer der Marke Invitrogen® diente als Laufpuffer. Als Größenstandard wurden 8 µl Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard aufgetragen. Zusätzlich wurden in vier weiteren Laufbahnen je 15 µl denaturiertes BSA in aufsteigenden Konzentrationen (0,1-1,0 mg/ml) aufgetragen. Dies sollte eine (semi-) quantitative Proteinbestimmung ermöglichen. In die verbleibenden Laufbahnen wurden ebenfalls je 15 µl der denaturierten Proben aufgebracht. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 100-140 V für ca. 1-1,5 h.

Im Anschluss wurde das Gel für etwa 10 Min. in aqua bidest. gewaschen und dann für ca. 1-1,5 h unter ständigem Schwenken mit Coomassie-Lösung gefärbt (je 45 Vol.-% aqua bidest./Methanol, 10 Vol.-% Eisessig, eine Spatelspitze/100 ml Coomassie Brilliant Blue G250). Im letzten Schritt konnte dann ungebundener Farbstoff mittels Coomassie-Entfärberlösung (je 10 Vol.-% Methanol/Essigsäure, 80 Vol.-% aqua bidest.) vom Gel entfernt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Aufbringen des Feldes auf die Niere

Insgesamt wurden 30 Wistar-Ratten zu Versuchen herangezogen. Davon entfielen 20 Tiere auf den Versuchsaufbau mit der Niere evertiert 'im Löffel' und weitere 10 Tiere auf die Variante mit der Niere 'in situ'. Ziel der Versuche war es, das elektrische Feld unter kontrollierten Versuchsbedingungen unmittelbar auf die linke Niere aufzubringen - entweder mit der Niere mobilisiert 'im Löffel' oder dem Organ verbleibend 'in situ'. Anschließend konnte der Urin jeweils seitentrennt auf Proteinurie bei angelegtem Wechsel- bzw. Gleichstrom untersucht werden.

Bei der Narkose-Einleitung und -Aufrechterhaltung zeigte sich die Inhalationsnarkose mit der Kombination Isoflurane/Fentanyl den per intraperitonealer Injektion verabreichten Anästhetika klar überlegen. Sowohl der hypnotisch-sedierende wie auch der analgetische Effekt waren bei den Injektionspräparaten in Bezug auf Wirkungseintritt und -stärke großen Schwankungen unterworfen. Demgegenüber zeichnete sich die Inhalationsnarkose durch verlässliche Wirkung und gute Steuerbarkeit aus. Darüber hinaus konnte sie das Verletzungsrisiko durch 'blinde' intraperitoneale Injektionen bei der Einleitung eliminieren. Einen Einblick von der Situation bei OP-Beginn vermittelt Abb. 4.1.

Für den anschließenden zentralvenösen Zugang wurde in der Regel ein Jugularis-Katheter verwendet. Die Anlage eines ZVK in die V. femoralis (Abb. 4.3) erwies sich bei den Versuchen insgesamt als weniger praktikabel, da für sie eine umfangreichere Präparation der Leiste erforderlich war (Abb. 4.2). Zusätzlich bestand bei dieser Variante ein größeres Risiko von Gefäßläsionen und dadurch bedingtem Volumenverlust. Gerade die V. jugularis zeigte - abhängig von Alter und Gewicht der Versuchstiere - zum Teil beeindruckende Größenunterschiede. Daher stellten sich die individuell für jedes Tier hergestellten Katheter als außerordentlich nützlich heraus und gewährleisteten ein insgesamt problemloses Volumen- bzw. Pharmaka-Management bei den Versuchen.

Bei Versuchen mit invasiver Blutdrucküberwachung wurde für die Sonde meist die zum ZVK kontralaterale A. carotis gewählt. Als operative Herausforderung erwies sich dabei das Einbringen und Fixieren des Katheters, dessen Durchmesser den der A. carotis meist deutlich übertraf.

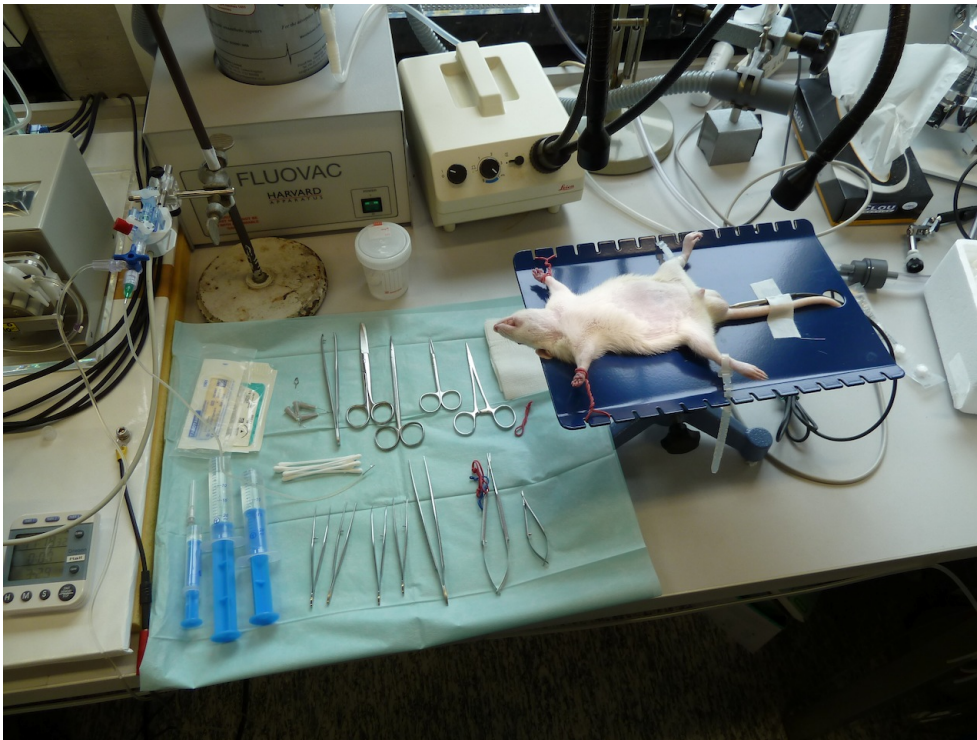


Abbildung 4.1: OP-Beginn

Überblick über die operative Situation nach Narkose-Einleitung und Vorbereitung des OP-Gebietes wenige Sekunden vor ‘Schnitt’ (hier: Eingriff in Injektionsnarkose). Das Versuchstier ist auf dem beheizten OP-Tisch fixiert, seine Körpertemperatur wird mittels Rektalsonde überwacht.

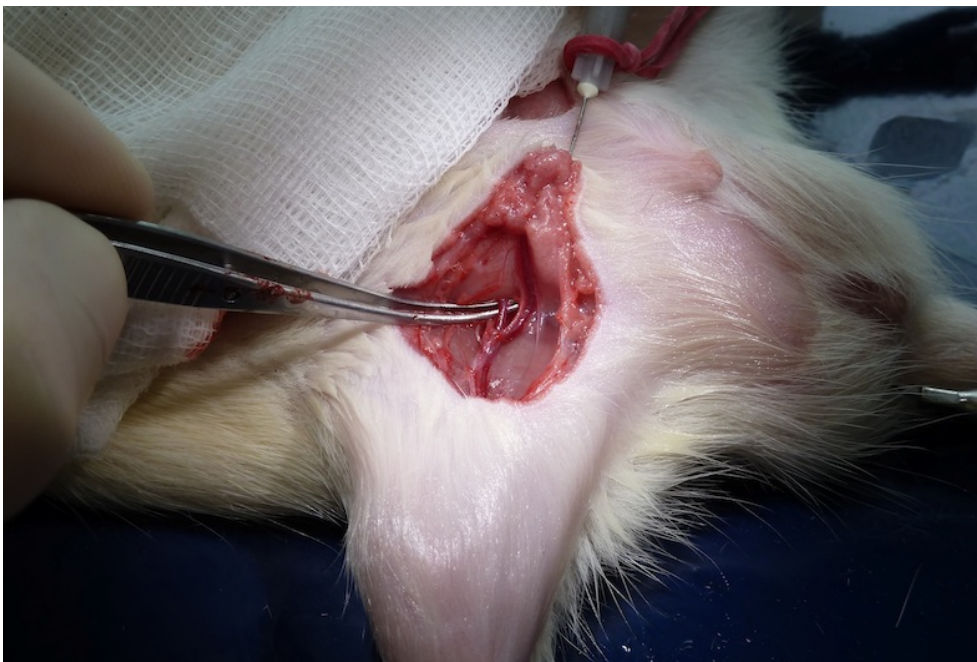


Abbildung 4.2: Präparation V. femoralis

Eröffnung der rechten Leistenregion zur ZVK-Anlage bis auf die Faszie und Darstellung der (venösen) inguinalen Gefäße: V. femoralis (über Pinzette) und V. epigastrica (Pinzettenspitze).

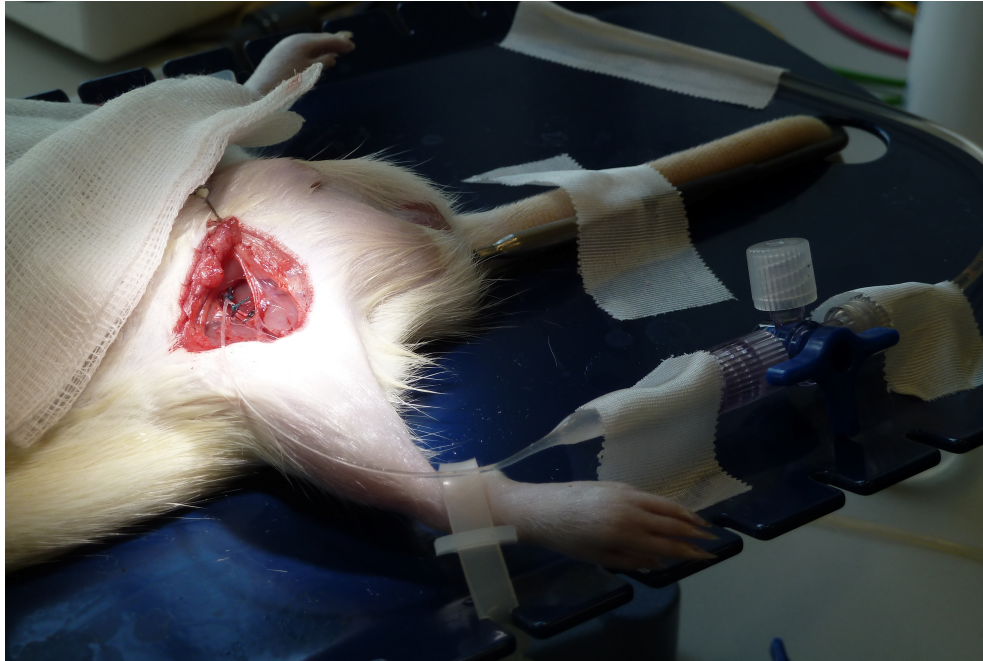


Abbildung 4.3: Femoralis-Katheter

Abschließende Übersicht nach erfolgter ZVK-Anlage in die rechte V. femoralis. Der Katheter ist bis in die Iliacalgefäße vorgeschoben und mittels Ligatur gegen Dislokation gesichert; Volumen wird über einen angeschlossenen Perfusor infundiert; der zwischengeschaltete Drei-Wege-Hahn (rechts) ermöglicht schnelle i.v. Medikamentenapplikation.

Eine Dislokation des Katheters oder vorzeitiges Lösen der Gefäßklemme führte dabei augenblicklich zu kaum beherrschbaren Blutungen, die bei beiden davon betroffenen Tieren innerhalb von ca. 5 bis 10 Sekunden letal verliefen. Bei der fixierenden Ligatur des Katheters war daher stets auf absolute Festigkeit zu achten, und das Öffnen der Gefäßklemme erforderte optimale zeitliche Koordination. Diese Operationsschritte setzten daher höchstmögliche Konzentration und operative Sorgfalt voraus. Von diesen potentiell gravierenden Komplikationen abgesehen, ermöglichte der Aufbau jedoch eine überaus zuverlässige und präzise Blutdrucküberwachung im gesamten Versuchsverlauf (Abb. 4.4 und 4.5). Die mit dieser Methode ermittelten Messwerte sind Kap. 4.3 zu entnehmen.

Ein bei der anschließenden Präparation auftretendes Problem stellte die Mobilisation der linken Niere in den 'Löffel' dar. Schon auf leichten Druck bzw. geringe Zugkräfte am Gefäßstiel reagierte die Niere äußerst sensibel mit Verblassen der Organoberfläche oder livid-bläulicher Verfärbung als Ausdruck arterieller Minderperfusion bzw. venöser Stauung. Da dabei von einer signifikanten Beeinflussung der Nierenfunktion auszugehen war, wurde die Entscheidung getroffen, die Niere nicht weiter 'im Löffel' evertiert zu lagern (Abb. 4.9), sondern die Messungen fortan mit der Niere 'in situ' durchzuführen (Abb. 4.6 und 4.7). Darüber hinaus entsprachen die elektrischen Eigenschaften des Agarose-Gels (Kap. 4.4) nicht den an sie gestellten Anforderungen und machten eine entsprechende Modifikation des Versuchsaufbaus ebenfalls notwendig.



Abbildung 4.4: Präparation A. carotis

Vorbereitungen zur Einlage der Blutdrucksonde in die A. carotis: Die Halsweichteile sind eröffnet und die Arterie in der Vagina carotica dargestellt; das Gefäß wurde distal ligiert, nach proximal mittels Gefäßklemme unterbunden und eine weitere Ligatur zur Fixierung des Katheters vorbereitet. Die Eröffnung der Arterie steht unmittelbar bevor.



Abbildung 4.5: Carotis-Katheter und Druckaufnehmer

Operative Situation nach erfolgter Anlage des Carotis-Katheters: Die Blutdrucksonde ist im Gefäß fixiert und per Silikonschlauch mit dem Druckaufnehmer (links oben) verbunden. Dieser wandelt die gemessenen Druckschwankungen in elektrische Signale um, die vom Computer ausgewertet werden können und so kontinuierliche Blutdrucküberwachung gewährleisten.

Die entscheidende Problematik während der Eingriffe war jedoch die eigentliche Uringewinnung bei den Versuchstieren. Die meisten Tiere zeigten nach Einbringen der Ureterkatheter (Abb. 4.8) kaum Diurese oder stellten diese im Versuchsverlauf praktisch ein. Dabei präsentierten einige der Tiere zusätzlich Symptome der Kreislaufzentralisation. Sie demonstrierten sichtbare Minderperfusion in abhängigen Extremitäten wie Schnauze und Pfoten. Auch der Darm zeigte im OP-Verlauf livide Verfärbungen und meist signifikante ödematöse Auftreibungen. In diesem Zusammenhang gestaltete sich bereits die Katheterisierung der Ureteren bei vielen Tieren als äußerst schwierig. Bedingt durch die geringe Füllung bei verminderter Diurese, kam es leicht zu traumatischen Dissektionen der Ureterwand durch den Katheter, was die Probengewinnung bei den betroffenen Tieren faktisch unmöglich machte.

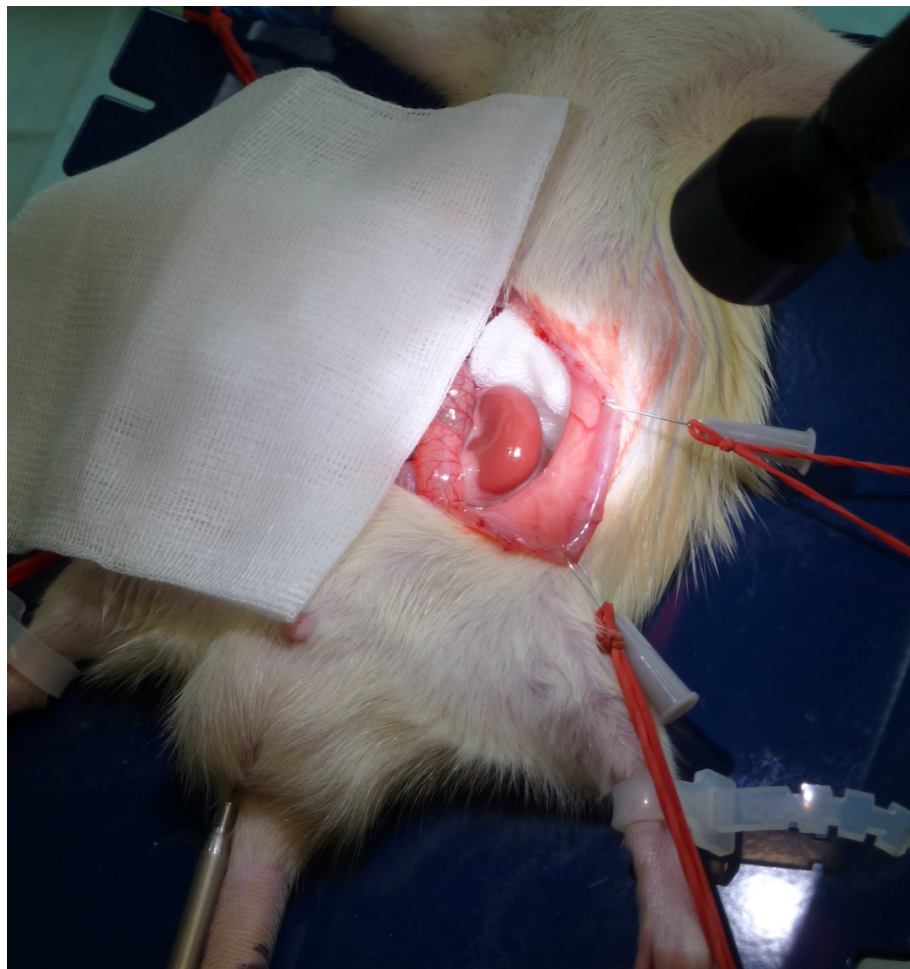


Abbildung 4.6: Präparation linke Niere

Zum Aufbringen der Kupferelektroden auf die Nierenoberfläche war diese zuvor vollständig von perirenalem Fett zu befreien. Das Darmpaket ist aus dem Situs rechts neben das Tier mobilisiert (unter befeuchteten Kompressen), um die Sicht auf die Niere freizugeben. Diese ist bei der Ratte intraperitoneal gelegen. In die Bauchhöhle eingebrachte Kompressen mobilisieren das Zwerchfell nach cranial und schützen sensible umliegende Strukturen (insbesondere die Milz) vor akzidentieller Verletzung.

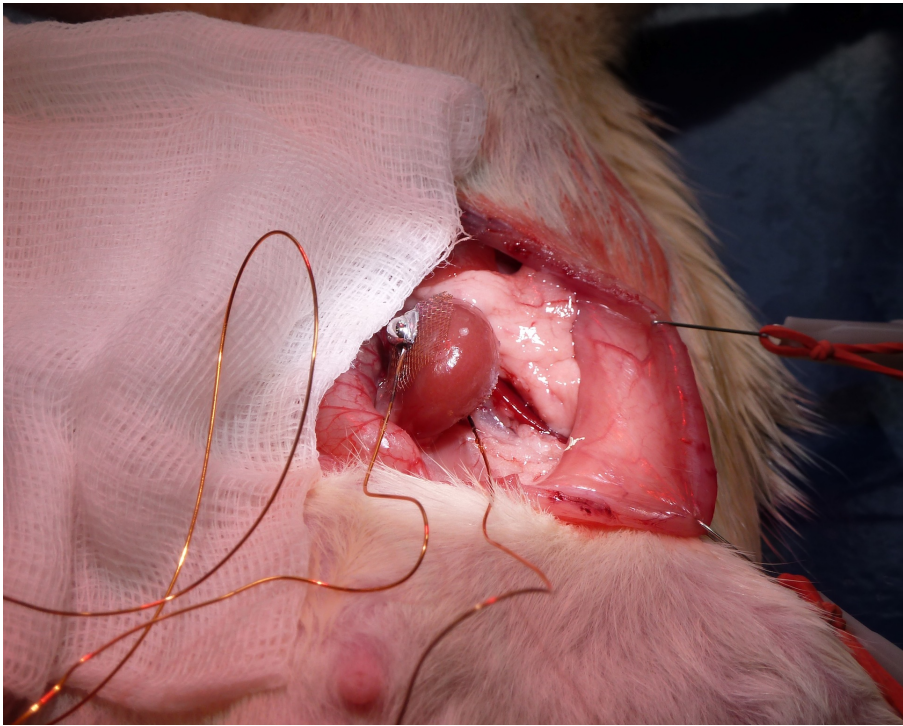


Abbildung 4.7: Aufbringen der Kupferelektroden

Nach Präparation der linken Niere sind die Kupferelektroden mittels Dermabond[®]-Hautkleber diametral auf Vorder- und Rückfläche des Organs befestigt worden.

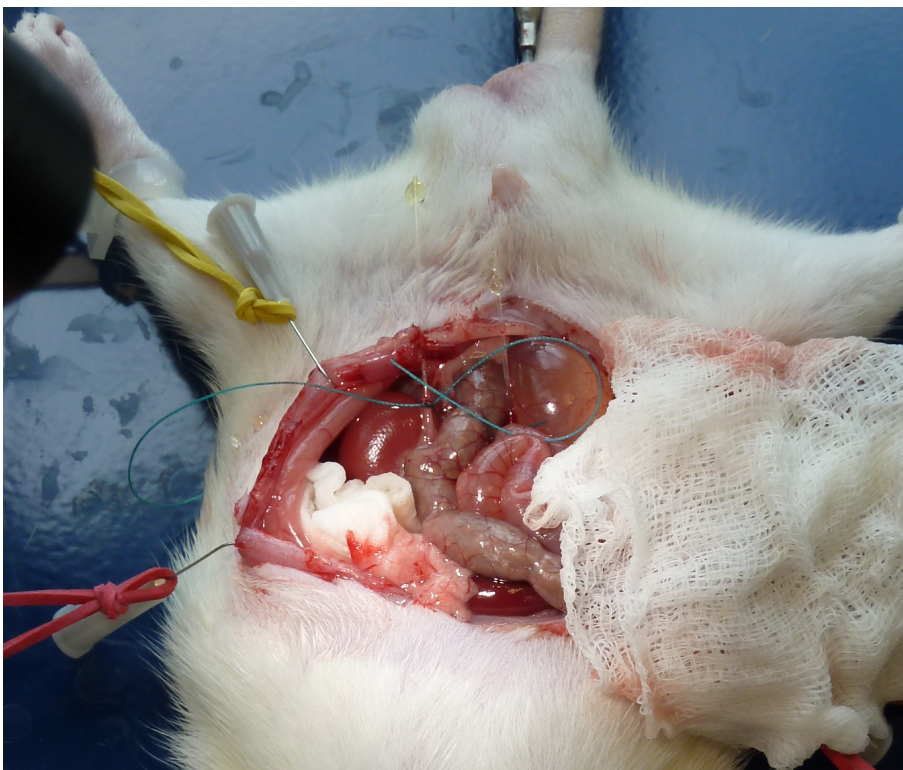


Abbildung 4.8: Abdominalsituation mit Ureter-Katheter

Die Bauchhöhle ist eröffnet und der Darm samt Mesenterium wurde weitgehend aus dem Situs mobilisiert (rechts, in feuchten Kompressen). Katheter sind in beiden Ureteren platziert und durch Ligaturen fixiert. Urin tritt an den Katheterenden aus und kann als Probe bei der Messung gesammelt werden.

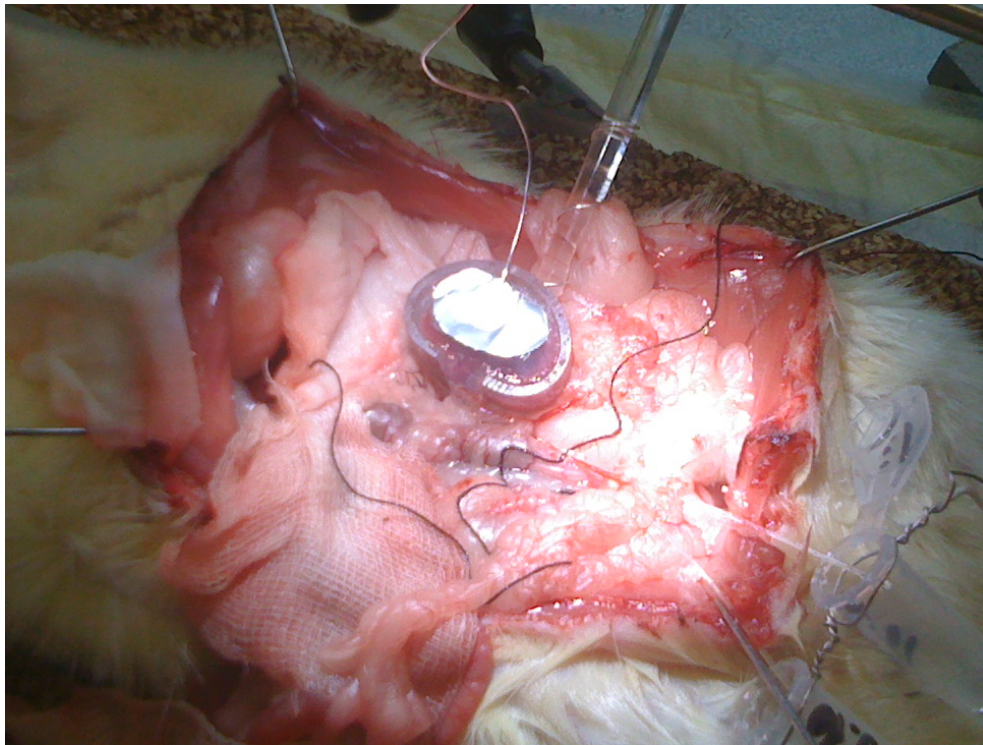


Abbildung 4.9: Messungen

Die linke Niere ist evertiert, in Agarose-Gel eingebettet und wurde im Löffel fixiert. Elektroden sind auf Vorder- und Rückfläche positioniert und verkabelt. Wechsel- bzw. Gleichstrom ist angelegt und Urinproben werden seitengetreunt in Eppendorf-Gefäßen asserviert.

Um dem Problem unzureichender Diurese zu begegnen, wurden systematisch in Frage kommende Auslöser untersucht. Das *Flüssigkeitsmanagement* während des Versuches wurde optimiert, um einem möglichen Volumenmangel und daraus folgendem prärenalem Nierenversagen vorzubeugen. Realisiert wurde dies u.a. mittels kontinuierlicher NaCl-Infusionen und feuchter Bauchtücher zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten. Des Weiteren wurden Maßnahmen zu Überwachung und Erhalt der *Körpertemperatur* während der OP intensiviert, um Hypo- oder Hyperthermie als Auslöser der Oligurie bei den Versuchstieren zu vermeiden. So kam eine Rotlichtlampe zum Einsatz, um dem Tier ausreichend Wärme zuzuführen, die Rektalsonde regulierte den temperierbaren OP-Tisch, und eine zusätzliche Temperatursonde war im ausgelagerten Mesenterium platziert. Schließlich wurden ebenfalls umfangreiche Anpassungen bei den im Versuch verwendeten *Pharmaka* durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine unerwünschte Arzneimittelwirkung bzw. -interaktion für die geschilderte Symptomatik verantwortlich war. Dosierung, Applikationsart und -intervall der Präparate wurden umfangreich modifiziert; es wurde mehrfach auf Alternativpharmaka zurückgegriffen und dabei auch von Injektions- auf Inhalationsanästhesie umgestellt. Trotz umfangreicher Fehleranalyse und der geschilderten Modifikationen an Versuchsaufbau und -durchführung persistierte diese Problematik in der Versuchsreihe. Sie war im Wesentlichen dafür verantwortlich, dass sich nur bei vier der insgesamt 30 in beiden Versuchsvarianten operierten Tiere vollständige Urinproben gewinnen ließen.

4.2 Proteinurie im elektrischen Feld

Zum besseren Verständnis ist in Tab. 4.1 noch einmal das Messprotokoll dargestellt:

Tabelle 4.1: Messprotokoll

Beschreibung	Zeit	Bezeichnung
Versuchsbeginn	0 - 15. min	'kein Strom'
Wechselstrom-Applikation	16. - 30. min	'Wechselstrom'
Gleichstrom-Applikation	31. - 45. min	'Gleichstrom'
15 min nach Gleichstrom	46. - 60. min	' +15 min'

4.2.1 Klinische Chemie

Es konnten bei den Messungen von insgesamt vier Versuchstieren vollständige Urinprobensätze gewonnen werden, die einer weiteren Untersuchung zugänglich waren (vgl. Kap. 3.3.2). Die nach Formel 3.2 auf S. 31 korrigierten relativen Proteinkonzentrationen für jedes Tier sind in Abb. 4.10 als Scatter Plot aufgetragen. Zusätzlich sind in Abb. 4.11 die arithmetischen Mittel der rechten Kontroll- und linken Verumniere als Säulendiagramm direkt gegenübergestellt. Nach Modellvorstellung wäre bei Wechselstrom-Applikation zunächst eine *unveränderte* Proteinurie gegenüber dem Ausgangswert zu erwarten gewesen. Im Anschluss daran hätte bei Gleichstrom die relative Proteinurie in der linken Niere gegenüber der Kontrollniere signifikant *ansteigen* sollen. Auch in der Sammelperiode danach wären noch erhöhte Proteinkonzentrationen im Urin der linken Niere zu erwarten gewesen. Der geschilderte Zusammenlang ließ sich anhand der ermittelten Werte nicht erkennen. Vielmehr zeigte sich bei den gewonnenen Werten ein uneinheitliches Bild mit z.T. erheblichen individuellen Abweichungen bei den Versuchstieren im Messverlauf (Abb. 4.10). Auch die gemittelten Messwerte aller Versuchstiere (Abb. 4.11) ließen keinen klaren Trend erkennen.

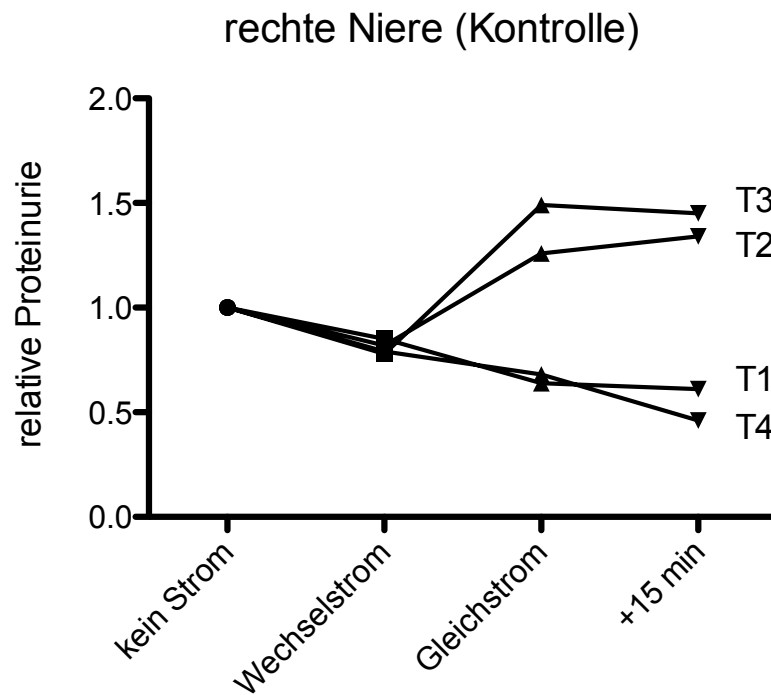
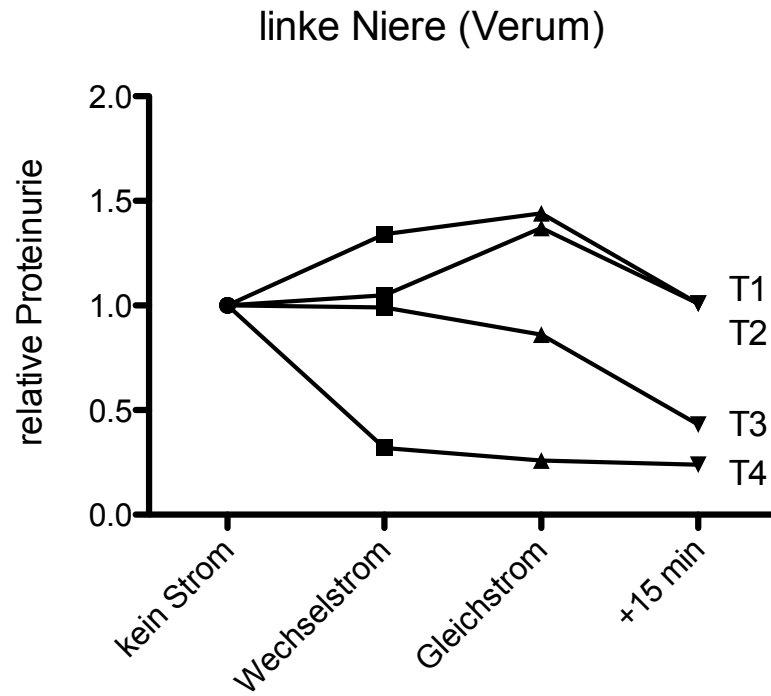


Abbildung 4.10: Relative Proteinurie (individuell)

Seitengetrennter zeitlicher Verlauf der Proteinausscheidung der Versuchstiere (T1 bis T4): linke Niere im elektrischen Feld (oben), rechte Niere als Kontrolle (unten). Die Proteinurie ist auf den individuellen Ausgangswert zu Versuchsbeginn normiert ('kein Strom' = 1,0) und die Werte des jeweiligen Versuchstieres sind durch Linien verbunden. Zu erwarten gewesen wäre ein signifikanter Anstieg von relativer Proteinurie in der linken Niere gegenüber der rechten Kontrollniere bei Gleichstrom-Applikation bzw. danach ('+15 min'). Dieser Zusammenhang ließ sich anhand der ermittelten Werte nicht erkennen.

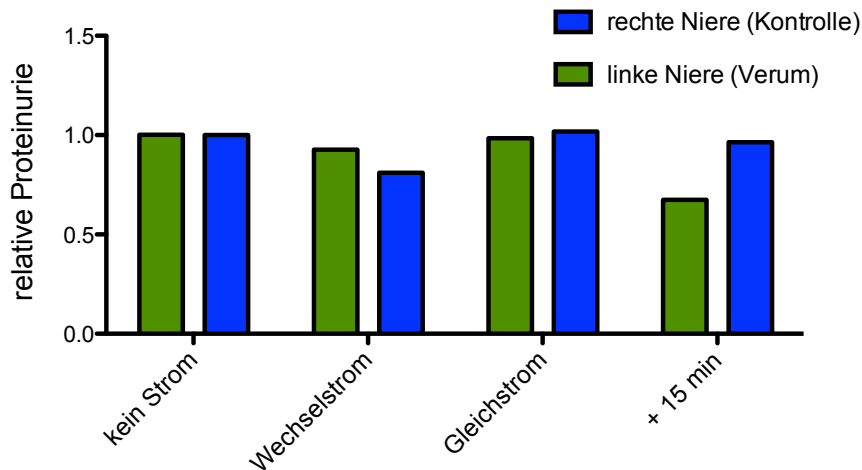


Abbildung 4.11: Relative Proteinurie (gemittelt)

Gezeigt ist in ähnlicher Weise wie in Abb. 4.10 die Proteinausscheidung im zeitlichen Verlauf des Versuchs. Hier ist die relative Proteinurie aller Versuchstiere (n=4) zusammengefasst als arithmetisches Mittel für rechte und linke Niere gegenübergestellt. Zu erwarten gewesen wäre wiederum ein signifikanter Anstieg der Proteinurie der Niere im elektrischen Feld (grüne Säulen) während Gleichstrom-Applikation bzw. danach ('+15 min') im Vergleich zur Kontrollniere (blaue Säulen). Diese Erwartung spiegelte sich in den bestimmten Werten nicht wider.

4.2.2 SDS-Gelelektrophorese

Zusätzlich zum klinisch-chemischen Proteinnachweis wurden die gewonnenen Urinproben ebenfalls mittels Gelelektrophorese analysiert. Durch diese zusätzliche Methode sollten zum einen die Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen auf Plausibilität geprüft werden. Dies war mit der SDS-Elektrophorese nur semi-quantitativ durch Vergleich mit BSA-Banden bekannter Konzentration möglich und hatte somit nur orientierenden Charakter. Zum anderen bot die Elektrophorese durch Auftrennung der Proben nach Molekulargewicht die Möglichkeit, die Proben bezüglich ihrer *Proteinzusammensetzung* zu untersuchen. Dies erleichterte die Ergebnisinterpretation gegenüber dem alleinigen Nachweis der Gesamtproteinkonzentration.

Exemplarisch sind nachfolgend die Gele der Urinproben zweier Versuchstiere dargestellt (Abb. 4.12 und 4.13). Bei beiden Gelen finden sich neben den zu erwartenden Banden des Größenstandards (1. Well v.l.) und des BSA-Mengenstandards (2.-5. Well v.l.) weitere distinkte Proteinbanden: So zeigen alle Proben der beiden Versuchstiere eine prominente Bande auf Höhe von ca. 60 kDa. Darüber hinaus sind bei beiden Tieren je drei zusätzliche Banden auf Höhe von ca. 10-15 kDa für den Urin aus der linken Niere während und 15 Minuten nach Stromapplikation zu erkennen (7.-9. Well v.l.).

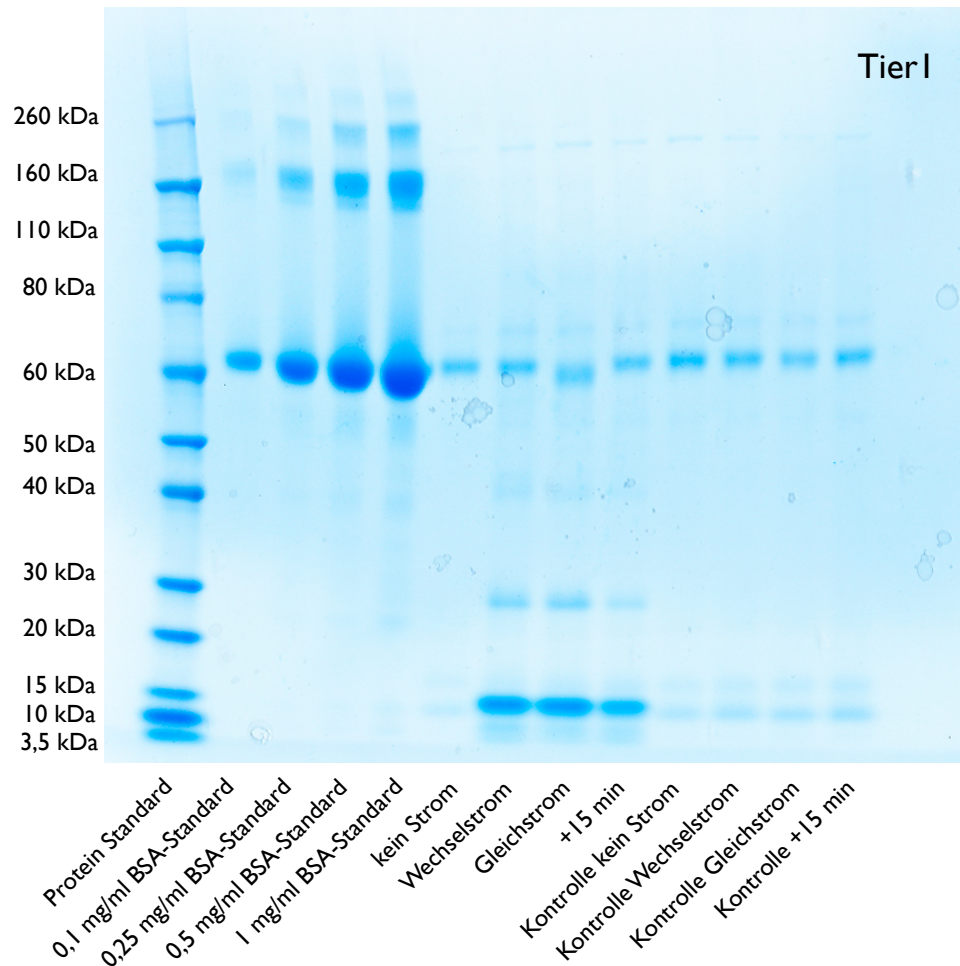


Abbildung 4.12: SDS-Gelelektrophorese (Tier 1)

Urin-Proteinmuster von Proben eines Versuchstieres ('Tier 1') seitengetreunt für linke (Verum-) Niere (6.-9. Well) und rechte (Kontroll-) Niere (10.-13. Well). Proteine sind elektrophoretisch in SDS-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt und mit Comassie angefärbt. Zusätzlich aufgetragen: Größenstandard (3,5 - 260 kDa, 1. Well) und BSA-Mengenstandard (0,25 - 1 mg/ml, 2.-5. Well). Es sind Protein-Banden bei 60 kDa sowie 10 bis 15 kDa in allen Urin-Proben zu erkennen. Die 60 kDa-Bande zeigt keine signifikante Unterschiede zwischen den Proben. Die Bande bei 10 bis 15 kDa in der linken (Verum-) Niere während/nach Stromapplikation erscheint prominenter (7.-9. Well) als in der rechten (Kontroll-) Niere (11.-13. Well).

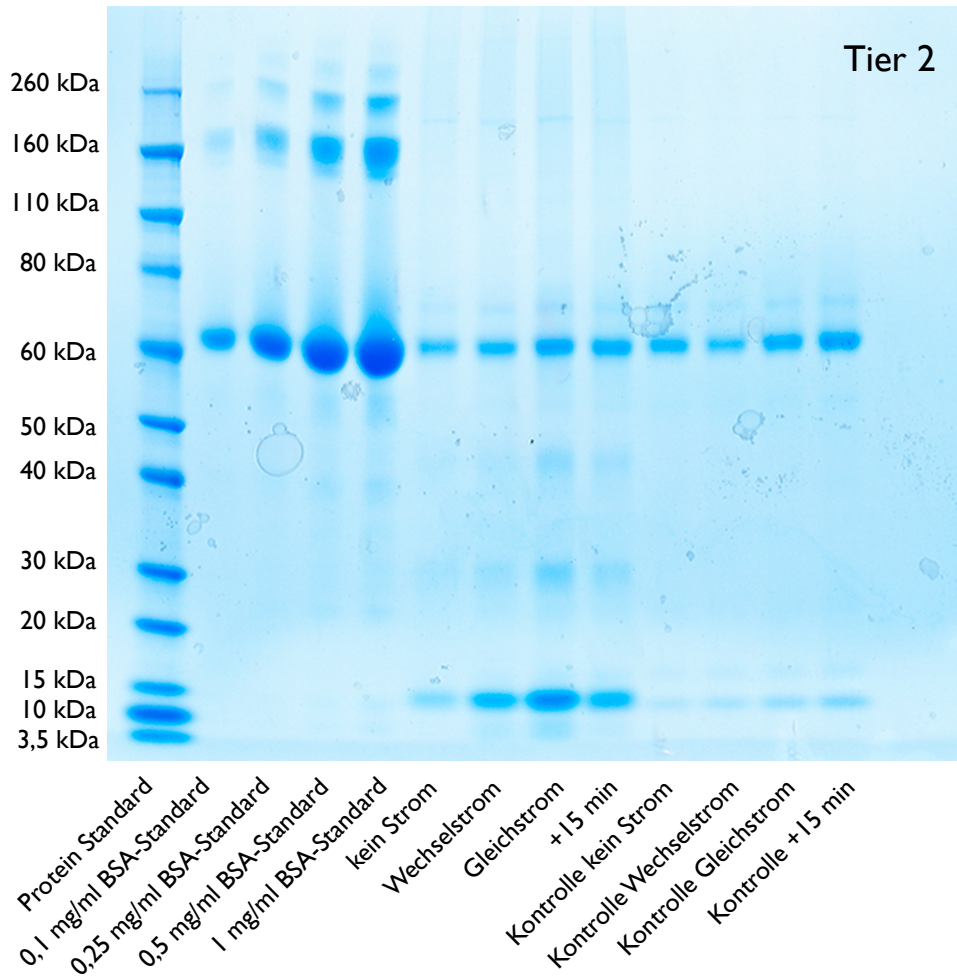


Abbildung 4.13: SDS-Gelelektrophorese (Tier 2)

Urin-Proteinmuster von Proben eines weiteren Versuchstieres ('Tier 2') und gleichem Beladungsmuster wie Gel in Abb. 4.12. Das Proteinmuster ähnelt dem von 'Tier 1' mit ebenfalls prominenteren Banden bei 10 bis 15 kDa in der Verum-Niere, verglichen mit der Kontroll-Niere.

4.3 Blutdruck

Der durchschnittliche diastolische Blutdruck in der Ratte beträgt 60-90 mmHg, systolische Werte liegen im Bereich von 75-120 mmHg [Pass & Freeth, 1993].

Auszugsweise sind in den nachfolgenden Grafiken die invasiv erhobenen Blutdruckkurven von drei verschiedenen Versuchstieren dargestellt. Bei zwei dieser Tiere wurde der Versuch in Injektionsnarkose mit Ketamin/Xylazin durchgeführt (Abb. 4.15). Demgegenüber zeigt Abb. 4.14 den Blutdruckverlauf während eines Eingriffs in Inhalationsnarkose mit Isoflurane/Fentanyl.

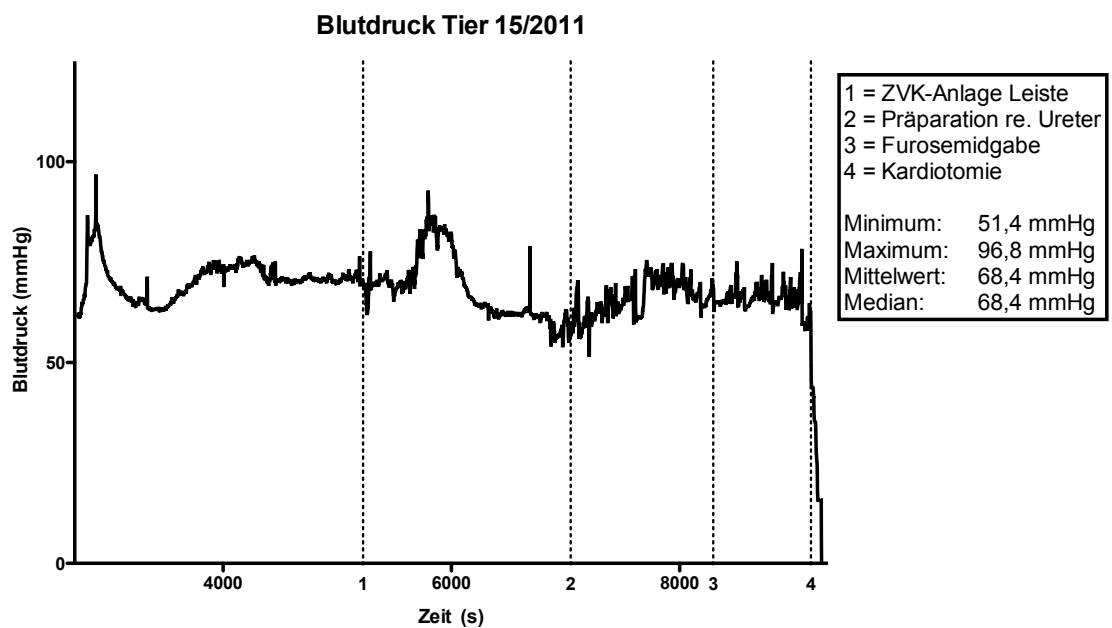


Abbildung 4.14: Invasiver Blutdruck, Inhalationsnarkose

Intraoperativer Blutdruckverlauf bei einem Tier in Isoflurane/Fentanyl-Narkose; ausgewählte Operationsschritte zeitlich markiert ('Marker 1-4' auf X-Achse). Insgesamt deutlich stabileres Blutdruckprofil während des Eingriffes als in Injektionsnarkose (vgl. Abb. 4.15).

Im Vergleich der ermittelten Blutdruckkurven fallen deutliche Unterschiede zwischen den Narkoseverfahren auf. So wies der Blutdruck bei den in *Injektionsanästhesie* operierten Tieren eine insgesamt hohe Schwankungsbreite auf. Demgegenüber ließ der Blutdruck bei Eingriffen in *Inhalationsnarkose* ein deutlich stabileres Profil über die Zeit erkennen. Gegen Ende der in Abb. 4.15 dargestellten Eingriffe in Injektionsnarkose wurde zusätzlich die Fähigkeit des Tieres zur adäquaten Antwort auf Katecholamine getestet ('Marker 3'). Dies erfolgte durch instrumentelle Manipulation der Nebenniere (Abb. 4.15 oben) bzw. i.v. Adrenalin-Gabe (Abb. 4.15 unten). Beide Tiere reagierten mit einer deutlichen Vaso-konstriktion (und Pulsakzeleration) mit Blutdruckanstiegen von 28 mmHg (Nebennieren-Manipulation) bzw. 79 mmHg (i.v. Adrenalin-Gabe).

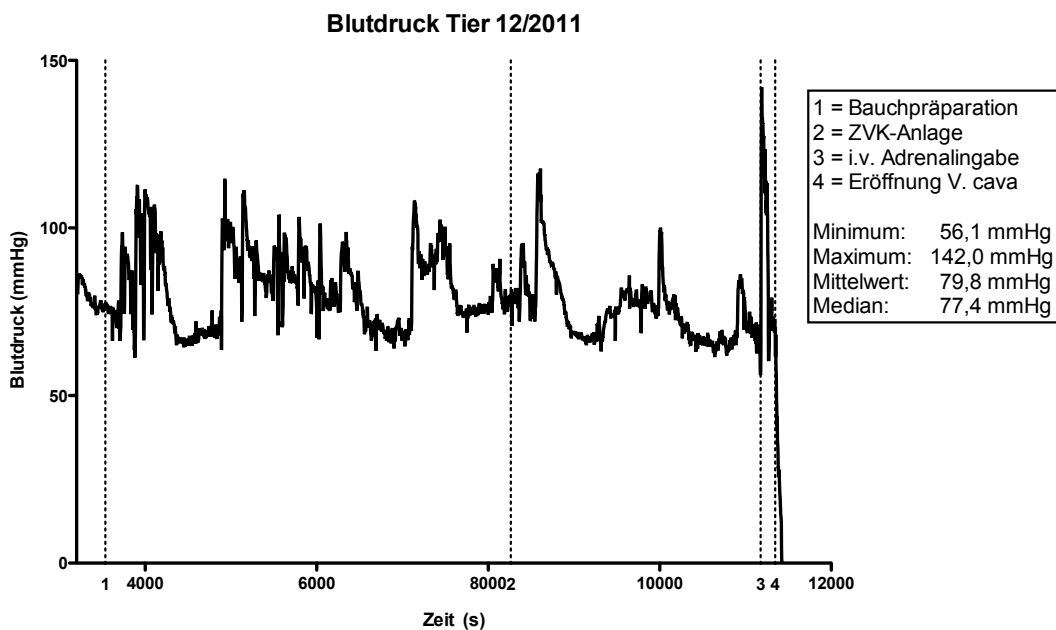
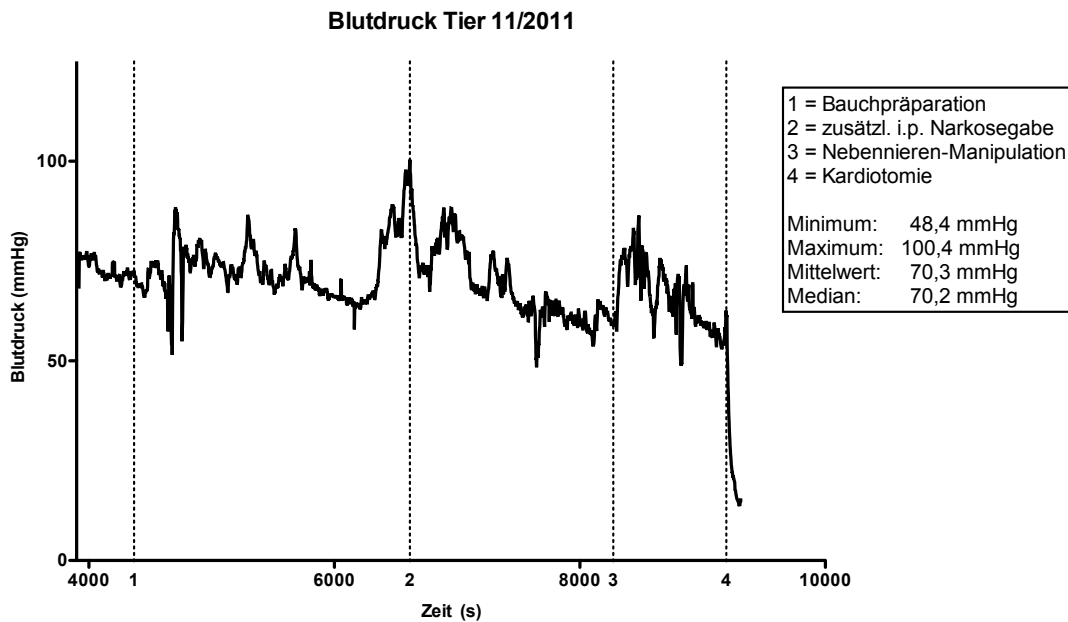


Abbildung 4.15: Invasiver Blutdruck, Injektionsnarkose

Intraoperativer Blutdruckverlauf bei zwei Tieren in Ketamin/Xylazin-Narkose; ausgewählte Operationsschritte sind zeitlich markiert ('Marker 1-4' auf X-Achse). Zu erkennen ist eine deutliche Blutdruckantwort auf Katecholamine durch Nebennieren-Manipulation ('Marker 3', oben) und i.v. Adrenalingabe ('Marker 3', unten). Insgesamt zeigt der Blutdruck beider Tiere eine hohe Variabilität über den Eingriffsverlauf.

4.4 Elektrotechnische Ergebnisse

Spannung

Bei den Versuchen konnten mit Hilfe der Gleich- bzw. Wechselspannungsgeneratoren konstante Spannungswerte erzeugt werden. Die angelegte effektive Spannung lag bei der Mehrzahl der Versuche bei 1,5 V. Für zwei Tiere wurde diese testweise auf bis zu 2,25 V erhöht.

Stromstärke

Die bei den Tieren gemessenen Stromstärken lagen bei angelegter Effektivspannung von 1,5 V im Bereich von 0,2 bis 0,45 mA. Für eine angelegte Effektivspannung von 2,25 V war bei den beiden Tieren ein auffällig hoher effektiver Stromfluss von 3,15 bzw. 3,4 mA zu bestimmen.

Widerstand

Sowohl die gemessenen wie auch die berechneten ohmschen Widerstände des Systems (Elektrodendrähte, Elektroden und Niere) wiesen eine große Streubreite auf. So schwankten die mittels Ohmmeter bestimmten Widerstände zwischen 3,9 und 25,0 k Ω (Mittel: 14,3 k Ω). Für die mit 1,5 V gemessenen Tiere errechnete sich der Widerstand nach dem Ohmschen Gesetz ($R = \frac{U}{I}$) zu Werten zwischen 3,3 und 7,5 k Ω (Mittel: 4,6 k Ω).

Elektrische Eigenschaften der Agarose

Wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Hochspannungstechnik der RWTH Aachen folgende elektrische Eigenschaften für die verwendete Agarose ermittelt:

Tabelle 4.2: Widerstand und Leitfähigkeit

Material	Widerstand (Ω)	spezifischer Widerstand ($\Omega \cdot cm$)
NaCl Agar	520	52.000
NaCl flüssig	490	49.000
Bidest Agar	939	93.900
Bidest flüssig	3880	388.000

Tabelle 4.3: Kapazität und relative Permittivität

Material	Kapazität C (nF)	rel. Permittivität ϵ_r
NaCl Agar	900	100.000
NaCl flüssig	880	100.000
Bidest Agar	1,25	141
Bidest flüssig	0,455	51

5 Diskussion

5.1 Aufbringen des Feldes auf die Niere

Mit der dargestellten Versuchsvariante gelang es, eine grundsätzlich vielversprechende Methode zu etablieren, um den Effekt von Strömungspotentialen auf die Filterfunktion der Niere genauer zu untersuchen. Der Aufbau ermöglicht es, verlässlich Gleich- und Wechsellspannungen über Elektroden unmittelbar auf die Nierenoberfläche aufzubringen. Störeffekte, wie sie beim Platzieren des gesamten Tieres in ein elektrisches Feld zu befürchten wären (Stichwort: 'Faradayscher Käfig'), können somit weitgehend ausgeschlossen werden. Besonders die Positionierung der evertierten Niere 'im Plexiglas-Löffel' ermöglichte durch die räumliche Trennung der Niere vom Situs die besten elektrotechnischen Voraussetzungen für die Anlage des Feldes. Darüber hinaus besitzt der Aufbau den großen Vorteil, den Urin unmittelbar nach der Filtration direkt aus dem Ureter asservieren zu können. Auf diese Weise sind unerwünschte Vermischungseffekte in der Blase und mögliche Veränderung der Proteinzusammensetzung durch Vorgänge im unteren Harntrakt als Störquellen beseitigt. Als wichtiger positiver Aspekt dieser Methode ist auch das Vorhandensein einer Versuchskontrolle zu nennen. Für jeden denkbaren Messzeitpunkt steht im Versuch immer auch ein Referenzwert in Form des Urins aus der rechten Niere zur Verfügung. Dadurch sind sowohl systemische Einflüsse auf die Urinzusammensetzung besser zu identifizieren als auch lokale Folgen der mechanischen Manipulation der linken Niere schärfer von einer Wirkung des elektrischen Feldes zu trennen. Die Möglichkeit zur i.v. Volumen- bzw. Medikamentenapplikation über den ZVK zusammen mit der kontinuierlichen arteriellen Blutdruckmessung in der A. carotis ergänzen den Aufbau um zusätzliche Kontroll- und Interventionsoptionen. Der offen-operative Aufbau mit der ständigen Möglichkeit zur visuellen Kontrolle während Messung und Eingriff rundet den Eindruck von einer stark standardisierten und dennoch zur flexiblen Reaktion auf individuelle Störgrößen fähigen operativen Methode ab.

Trotz dieser grundsätzlich positiven Beurteilung sind auch die Schwächen der Methode zu diskutieren. Diese betreffen insbesondere die in den Versuchen zunächst umgesetzte Variante mit der Niere 'im Löffel'. So wirken bei der Mobilisierung und Lagerung der Niere in der Halterung große Zugkräfte auf Organoberfläche und Nierenhilus, welche das Parenchym direkt schädigen bzw. die arterielle wie venöse Gefäßversorgung einschränken können. Folglich ist eine Beeinflussung der Messungen durch diesen mechanischen Faktor denkbar, wenn nicht sogar wahrscheinlich.

Darüber hinaus sprechen die elektrotechnischen Eigenschaften des Agarose-Gels, welches die Niere 'im Löffel' umhüllte, gegen diese Versuchsvariante. Das mit Bidest angesetzte (vermeintlich elektrisch *isolierende*) Gel besitzt - entgegen den Erwartungen - lediglich den doppelten ohmschen Widerstand gegenüber dem NaCl-Agar, der zur elektrischen *Koppelung* der Elektrode mit der Nierenoberfläche eingesetzt wurde! Daher wird der Aufbau eines elektrischen Feldes in der Niere erheblich erschwert, weil Ladungen relativ leicht über das Bidest-Agar *um die Niere herum* fließen können. Aus diesen Gründen ist die Verwendung der Kupferelektroden - wie sie bei der Variante mit der Niere 'in situ' zum Einsatz kamen - klar zu favorisieren. Doch auch bei Verwendung letzterer ist keine sichere Aussage darüber möglich, ob tatsächlich ein elektrisches Feld über der Niere entstand und dieses ausreichende Feldstärke entwickelte. Diese Fragestellung wird geschlossen in Kap. 5.4 diskutiert. Das Kernproblem während der Versuche, nämlich das der unzureichenden Diurese bei den Messungen, soll hingegen bereits im nachfolgenden Abschnitt erörtert werden.

Warum zeigten die Nieren so geringe Diurese?

Eine suffiziente Diurese in der gesamten Messperiode des Versuches war essentielle Voraussetzung, um reproduzierbar Urin-Proben in den einzelnen Messabschnitten gewinnen zu können. In Anbetracht der Tatsache, dass die Diurese in der Regel in beiden Nieren abnahm bzw. sistierte und zusätzliche generalisierte Symptome einer Kreislaufzentralisation zu beobachten waren, ist am ehesten von einer *systemischen* Ursache auszugehen. Dagegen sind *lokale* Ursachen an der Niere, wie z.B. mechanische Irritation mit Ischämie oder postrenale Obstruktion, als wenig wahrscheinlich zu bewerten. Sie hätten in der Regel nur eine Niere betroffen, und ihre systemischen Effekte wären vergleichsweise gering gewesen. Vor allem aber trat die Problematik auch bei zur Fehlersuche durchgeführten 'Shunt-Operationen' auf. Bei ihnen wurde zwar der Eingriff nach Protokoll begonnen und die Bauchhöhle eröffnet, jedoch anschließend keine Manipulationen an den Nieren durchgeführt. Als systemische Auslöser kommen dabei im Versuch im Wesentlichen in Frage: eine Störung des *Volumenhaushaltes*, ein Problem der *Temperaturhomöostase* oder eine unerwünschte *Arzneimittelwirkung* bzw. *-interaktion* der verwendeten Pharmaka. Es bestehen offensichtliche Überschneidungen und gegenseitige Beeinflussung zwischen diesen in Betracht kommenden Faktoren.

Ein Volumenproblem?

Es ist allgemein bekannt, dass eine Hypovolämie - unabhängig von der Genese - ein akutes (prärenales) Nierenversagen auszulösen vermag. In der Folge geht die Diurese zurück, und harnpflichtige Substanzen werden vermehrt retiniert. Als mögliche Ursachen sind im vorliegenden Aufbau grundsätzlich sowohl *absoluter* Volumenmangel (durch Blutverlust oder vermehrte Verdunstung über den OP-Situs) wie auch eine *relative* Hypovolämie (z.B. durch Anaphylaxie oder Sepsis) zu diskutieren. Für letztere gab es jedoch intraoperativ

keinerlei Hinweise, insbesondere, weil nur seit Jahren an der Ratte etablierte Pharmaka zur Anwendung kamen und großen Wert auf steriles (bzw. keimarmes) Vorgehen gelegt wurde. Auch erscheint es unwahrscheinlich, dass sich eine kreislauffrelevante septische Situation innerhalb des relativ kurzen Zeitraums von OP-Einleitung bis zur Katheterisierung der beiden Ureteren (im Mittel etwa 45-60 Minuten) hätte ausbilden können [Nduka & Parrillo, 2009]. Zur Vermeidung der - hier wahrscheinlicheren - *absoluten* Hypovolämie wurden mehrere Maßnahmen ergriffen: Neben der kontinuierlichen Volumensubstitution per ZVK wurde Verdunstungsverlusten entgegengewirkt und intraoperative Blutverluste auf ein absolutes Minimum reduziert. Durch ständige klinische Beurteilung und invasive Blutdruckmessung wurde der Volumenstatus kontinuierlich überwacht. Diese Anstrengungen sowie die im Versuch ermittelten Parameter machen ein signifikantes Volumendefizit als Ursache insgesamt unwahrscheinlich. Sie können die Volumensituation jedoch letztlich nur näherungsweise beurteilen (siehe auch Kap. 5.3). Die tatsächliche Perfusionssituation der Niere wäre nur durch weitere Methoden genauer bestimmbar, z.B. dopplersonographisch oder invasiv direkt in der Arteria bzw. Vena renalis. Diese Methoden sind jedoch am Rattenmodell nur äußerst schwer zu realisieren.

Ein Temperaturproblem?

In Betracht kommt hier vor allem ein übermäßiger Wärmeverlust des Tieres während des Eingriffs und damit die Entwicklung einer *Hypothermie*: so war während des Versuchs die Bauchhöhle weiträumig eröffnet und der Hals - z.T. beidseits - freigelegt. Auch wurde das Darmpaket in einer feuchten Kompresse aus dem Situs ausgelagert, um ausreichend Raum zur Präparation zu schaffen. Diese operative Situation prädisponiert zu hohem Wärmeverlust und addiert sich zu dem ohnehin bei Eingriffen in Allgemeinanästhesie bestehenden Hypothermie-Risiko [Flecknell, 2009]. In der Folge wäre im Rahmen dann einsetzender Zentralisationsmechanismen und späterer Abnahme des Herzzeitvolumens auch eine Einschränkung der Nierenfunktion denkbar. Dabei lassen sich die weiteren beobachteten Symptome wie die periphere Zyanose mit dieser Überlegung durchaus vereinbaren. Im Verlauf der Versuchsreihen wurden umfangreiche Anstrengungen unternommen, um eine Hypothermie als Fehlerquelle zu identifizieren und ihr ggfs. mit adäquaten Maßnahmen zu begegnen. Von Beginn des Eingriffs an wurde die Körperkerntemperatur der Ratte über eine Rektalsonde gemessen und die Heizleistung des OP-Tisches automatisch daran angepasst. Darüber hinaus wurde eine weitere Temperatursonde im ausgelagerten Darmpaket platziert, um eine Hypothermie an dieser exponierten Stelle frühzeitig zu erkennen. Zusätzlich zum beheizbaren OP-Tisch sorgte eine Rotlichtlampe für weitere Wärmezufuhr. Dank dieser Maßnahmen waren bei den Eingriffen keine Temperaturabfälle unter 36 °C Körpertemperatur mehr zu verzeichnen. Ein reine Hypothermie als primäre Ursache für die geringe Diureseleistung der Tiere kann damit weitestgehend ausgeschlossen werden. Dennoch erscheint grundsätzlich denkbar, dass eine latente Hypothermie den tatsächlichen Auslöser der Oligurie in seiner Wirkung negativ verstärkte.

Ein Narkoseproblem?

In den Versuchen kamen mehrere Pharmaka zur Anwendung, die potentiell in der Lage waren, die Nierenfunktion zu beeinträchtigen und damit die beobachtete Oligurie bzw. Anurie während der Versuche auszulösen. Zunächst muss allgemein bei den im Versuch verwendeten Injektionsnarkosen davon ausgegangen werden, dass sie weniger konstante Wirkspiegel erreichen als die kontinuierlich zugeführte Inhalationsnarkose. Feste Applikationsintervalle bzw. kontinuierliche i.v.-Gabe des Anästhetikums im Perfusor können diesen Effekt nur teilweise kompensieren. Somit ist bei Injektionsnarkosen insgesamt mit einem höheren Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen (Wirkspiegel $\uparrow\uparrow$) bzw. sympathikotone Effekte (Wirkspiegel $\downarrow\downarrow$) zu rechnen als bei Inhalationsnarkosen. Diese Überlegung unterstreicht auch der Vergleich der Blutdruckkurven beider Anästhesieverfahren in Kap. 4.3. Bei der im Versuch zunächst standardmäßig verwendeten Kombination *Ketamin/Xylazin* kommen vor allem (unerwünschte) Wirkungen des α_2 -Agonisten Xylazin in Betracht. So senkt das Präparat in niedrigeren Dosierungen u.a. das *Herzminutenvolumen* [Yamashita et al., 2000] und prädisponiert zu *Hypothermie* durch Beeinträchtigung der Thermoregulation [Rector et al., 1996]. Gleichzeitig zeigt Xylazin neben α_2 - auch α_1 -agonistische Wirkung [Thurmon et al., 1996] und kann auf diese Weise *vasokonstriktiv* wirken [Tranquilli et al., 1984]. Xylazin besitzt also mehrere pharmakologische Eigenschaften, die eine akute Nierenfunktionsstörung während des Versuches begünstigen oder sogar auslösen konnten. Allerdings sind in der Literatur auch Xylazin-Charakteristika beschrieben, die dieser Hypothese entgegenstehen. So wird Xylazin sogar eine *Diuresesteigerung* [Doherty, 1988] durch verminderte Freisetzung des Antidiuretischen Hormons im Hypothalamus [Cullen, 1999] zugesprochen - eine Beobachtung, die sich mit den Erfahrungen während der Versuche nur schwer in Deckung bringen lässt. Das als Alternative zu Xylazin verwendete *Medetomidin* (wieder als Kombinationsanästhesie mit Ketamin) ist ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der α_2 -Agonisten. Es besitzt ein insgesamt dem Xylazin sehr ähnliches (Neben-) Wirkungsprofil - einschließlich negativer kardiovaskulärer Effekte wie der Reduktion des Herzminutenvolumen [Sinclair, 2003]. Gleichzeitig weist es jedoch eine signifikant höhere Selektivität für α_2 -Rezeptoren auf und reduziert so deutlich das Risiko von α_1 -Rezeptor vermittelter Vasokonstriktion gegenüber Xylazin. Da nun im Versuch zwischen den beiden Varianten Ketamin/Xylazin und Ketamin/Medetomidin keine signifikanten Unterschiede in der Diurese-Leistung zu beobachten waren, ist ein relevanter negativer vasokonstriktiver Effekt auf die arterielle Nierenstrombahn (über α_1 -Agonismus) als unwahrscheinlich zu bewerten. Auch sonst rückt ein Narkoseproblem als Ursache für die unzureichende Diurese insgesamt in den Hintergrund. Weder die in kleinen Versuchsserien als Injektionsnarkose verwendete Kombination *Pentobarbital/Fentanyl* noch die Inhalationsnarkose *Isoflurane/Fentanyl* konnten den OP-Verlauf in Bezug auf die Nierenfunktion günstig beeinflussen. Zweifellos besitzen auch letztgenannte Substanzgruppen unerwünschte kardiovaskuläre Wirkungen

[Plumb, 1999, Russo & Bressolle, 1998]. Dennoch ist wohl kaum davon auszugehen, dass die Nierenfunktion im Versuch von allen verwendeten Substanzklassen und sämtlichen Applikationsformen in gleichem Maße negativ beeinflusst worden wäre. Abschließend muss auch hier wieder die Möglichkeit eines multikausalen Geschehens, z.B. im Sinne einer pharmakologischen Verstärkung der Effekte einer latent bestehenden Hypothermie, in Erwägung gezogen werden.

5.2 Proteinurie im elektrischen Feld

5.2.1 Klinische Chemie

Unter der Annahme, dass das intrinsische Potential der Niere durch ein von außen angelegtes elektrisches Feld gestört werden könnte, wäre in der linken Niere der Versuchstiere bei Gleichstrom eine Zunahme der Proteinausscheidung zu erwarten gewesen. Dieser Zusammenhang lässt sich anhand der Versuchsergebnisse nicht verifizieren. Auch darüber hinaus ist bei der Beurteilung der Messproben kein klarer Trend erkennbar. Als verantwortlich für dieses Ergebnis sind mehrere mögliche Ursachen zu diskutieren. Es ist zunächst die Frage zu beantworten, ob überhaupt ein ausreichend starkes elektrisches Feld auf die Niere wirken konnte, welches das intrinsische Potential hätte signifikant beeinflussen können (Kap. 5.4). Darüber hinaus ist zu überlegen, ob die Wirkung des intrinsischen Feldes auf die Proteinurie relativ zu klein war und so von Störfaktoren im Versuch überlagert werden konnte. Dieses Problem würde durch die geringe Anzahl an verwertbaren Proben noch deutlich verstärkt. Denkbar sind in diesem Kontext vor allem *thermische Schäden* durch die angelegte Spannung, die eine signifikante Proteinurie ausgelöst haben könnte. Auch Verunreinigungen der Proben z.B. mit Blut (s.u.) sind denkbar. *Systemische Ursachen* treten dagegen bei den Versuchen eher in den Hintergrund, da mit den jeweiligen Proben aus der rechten Niere stets eine Kontrolle zur Verfügung steht. Auf diese Weise können die gewonnenen Messwerte relativ leicht um ihren Einfluss auf die Proteinurie bereinigt werden.

5.2.2 SDS-Gelelektrophorese

In der SDS-Gelelektrophorese waren für beide Tiere distinkte Banden in den Urin-Proben bei etwa 60 kDa festzustellen. Zusätzlich fanden sich in den Proben der linken Niere während und nach Stromapplikation auch Banden bei etwa 15 kDa.

Die 60 kDa-Banden sind dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit als *Albumin*-Anteil der Probe zu interpretieren, welcher für Ratten ein Molekulargewicht von ca. 65 kDa besitzt [Peters, 1962]. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass die klinisch-chemisch bestimmte *Gesamtkonzentration* für Proteine bei den Versuchen auch überwiegend von Albumin getragen wurde. Dieses *glomeruläre* Proteinmuster ist als Folge der Manipulation mit Hilfe des elektrischen Feldes zu erwarten und erwünscht. Ein z.B. primär *tubuläres* Protein-

muster im Gel mit vermehrter Ausscheidung von mikromolekularen Proteinen (α_1 -/ β_2 -Mikroglobulin u.a.) hätte hingegen eine grundsätzlich andere Bewertung der klinisch-chemischen Ergebnisse erfordert [Schrier, 2008]. Die zweiten Banden im Gel bei rund 15 kDa lassen sich gut mit dem Molekulargewicht von *Hämoglobin* vereinbaren, welches ca. 16 kDa beträgt [Simpson, 2003]. Letztere können damit als Ausdruck einer *Mikrohämaturie* in der linken Niere gewertet werden. Als mögliche Auslöser sind Gefäßläsionen durch den angelegten Strom oder die mechanische Manipulation während der Lagerung in Betracht zu ziehen, welche dann Anschluss an das Tubulussystem fanden. Ebenfalls sind kleine Verletzungen der Ureterwand bei Einbringen und Vorschub des (relativ scharfkantigen) Kunststoffkatheters nicht auszuschließen. Unabhängig von der Ursache korreliert die Hämoglobinurie bei den Tieren 1 und 2 im SDS-Gel gut mit der bei diesen Tieren erhöhten Proteinurie während Gleichstromgabe (s. Kap. 4.2). Folglich wäre diese Albuminurie zumindest teilweise auf Verschmutzungseffekte durch Übertritt von Blut in den Urin zurückzuführen.

5.3 Blutdruck

Die invasive Blutdruckmessung wurde bei den Versuchen im Wesentlichen durchgeführt, um unzureichende Nierenperfusion und ein daraus folgendes *prärenales Nierenversagen* als Ursache der (zu) geringen Diurese ausschließen zu können (s. Kap. 5.1). Trotz der relativ großen Schwankungsbreite im Versuchsverlauf fanden sich keinerlei Hinweise für relevante intraoperative Blutdruckabfälle, welche die Nierenperfusion hätten signifikant einschränken können. Folglich wäre diese Ursache als weniger wahrscheinlich zu bewerten. Gleichzeitig gilt es jedoch zu beachten, dass der gemessene arterielle Mitteldruck in der A. carotis zwar mit dem Druck in der A. renalis *korreliert*, jedoch nicht mit ihm *gleichgesetzt* werden darf. Insbesondere die Wirkung vermehrter Katecholaminausschüttung auf den Vasotonus der A. carotis unterscheidet sich grundlegend vom Effekt auf die Nierengefäße. Während ein erhöhter Sympathikotonus über β_2 -Rezeptoren eine vornehmlich *vasodilatierende* Wirkung auf die kopfversorgenden Gefäße besitzt, überwiegt an den Aa. renales eine über α_1 -Rezeptoren vermittelte *Vasokonstriktion*. Es wird in der Literatur weiterhin kontrovers diskutiert, welche klinische Bedeutung diesem Effekt in Bezug auf das Risiko eines akuten (prärenal) Nierenversagens beikommt. Diese Überlegungen geschehen meist im Kontext der vasopressiven Therapie auf Intensivstationen [Havel et al., 2011]. Dennoch ist der negative Effekt von Katecholaminen auf die Nierenperfusion u.a. auch in neueren Tierexperimenten an der Ratte gut belegt [Badzyńska & Sadowski, 2011]. Somit kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass der Nierenperfusionsdruck während der Versuche deutlich unter den ermittelten Blutdruckwerten der A. carotis lag. Ein akutes (prärenales) Nierenversagen kommt folglich weiterhin als alleinige oder zusätzliche Ursache für die geringe Diurese in Betracht.

5.4 Elektrotechnische Ergebnisse

Lag ein ausreichendes Feld über der Niere an?

Bei allen Versuchstieren konnte nach Anlage der Spannung am Generator auch ein Stromfluss zwischen den beiden Elektroden gemessen werden. Dies ist zwar eine notwendige, jedoch keine hinreichende Bedingung dafür, dass tatsächlich ein elektrisches Feld über der Niere aufgebaut wurde. So lässt sich aus dem Stromfluss nicht ohne weiteres ableiten, welchen genauen Weg die Ladungsträger zwischen den beiden Elektroden gewählt haben. Im Idealfall fiel die Spannung kontinuierlich über der Niere ab und ermöglichte die Entstehung eines homogenen elektrischen Feldes. Im ungünstigsten Fall aber floss die Ladung - dem Weg des geringsten elektrischen Widerstands folgend - nur über die Organoberfläche oder das perirenale Gewebe zur anderen Elektrode ab; Letzteres vor allem bei der Lagerung der Niere 'in situ'. Ein annähernd homogenes elektrisches Feld wäre in diesem Fall über der Niere sicher nicht zu erwarten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass bei 50 % erhöhter Spannung (2,25 V statt 1,5 V) rund 10-fach (!) größere Ströme zu messen waren. Mit konstantem Widerstand R des 'Systems Ratte' (Niere, Elektroden, Drähte) wäre nach $I = \frac{U}{R}$ dagegen ein ebenfalls nur 50 % höherer Stromfluss I zu erwarten gewesen. Als Erklärung denkbar wären beschriebene Gewebsbrücken o.ä., die eine Verbindung geringeren Widerstands zwischen den Elektroden darstellten und so einen effektiven Feldaufbau über der linken Niere verhinderten.

Der Vergleich des resistiven Widerstandes der Niere (mit Elektroden und Drähten) mit den Widerständen der Agarose-Gele aus dem Versuchsaufbau mit der evertierten Niere 'im Löffel' kann ebenfalls helfen, die Vorgänge in der Niere besser einzuschätzen. In der Literatur werden als spezifischer Widerstand der Niere im Mittel 211 Ωcm angegeben [Faes et al., 1999]. Die Messungen mit Ohmmeter bzw. Berechnungen über das ohmsche Gesetz ergaben Nieren-Widerstände im Bereich *mehrerer Kiloohm* ($\text{k}\Omega$). Im Vergleich dazu war das - eigentlich zur *Isolierung* (!) konzipierte - Bidest-Agar mit knapp unter 1 $\text{k}\Omega$ Widerstand signifikant leitender. Die Ladungsträger haben also mit hoher Wahrscheinlichkeit vornehmlich den Weg um das Organ *herum* gewählt. In abschließender Betrachtung ist bei diesem Versuchsaufbau daher nicht davon auszugehen, dass ein ausreichendes Feld *über* der Niere aufgebaut werden konnte.

5.5 Zusammenfassende Beurteilung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss extrazellulärer Strömungspotentiale auf die glomeruläre Filtration weitergehend *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck gelang es, am Modell der Ratte eine Methode zu entwickeln, um elektrokinetische Effekte innerhalb der Niere durch ein von außen appliziertes elektrisches Feld zu beeinflussen. Dadurch sollten indirekt Rückschlüsse auf die Eigenschaften dieser endogenen elektrischen Effekte ermöglicht werden. Der in dieser Arbeit hervorgebrachte Versuchsansatz das elektrische Feld direkt auf das Organ aufzubringen gewährleistet, Störeffekte durch den Körper des Tieres zu vermeiden. Der Ansatz zeichnet sich zusätzlich durch ein hohes Maß an Standardisierung des Versuchsablaufs bei gleichzeitig flexiblen Überwachungs- und Interventionsmöglichkeiten aus. Darüber hinaus bietet er - mit den Proben aus der rechten Niere - den großen Vorteil einer kontinuierlichen Versuchskontrolle.

Bei den gewonnenen Messergebnissen ließen sich die erhofften Zusammenhänge von angelegter Gleichspannung und vermehrter Proteinurie nicht nachweisen. Dafür sind im Wesentlichen *zwei Einflussfaktoren* verantwortlich zu machen. Erstens konnte mit den verwendeten Materialien und dem gewählten Aufbau mit großer Wahrscheinlichkeit *kein homogenes Feld* über der gesamten Niere erzeugt werden. Das im Versuch zunächst zur Isolation verwendete Agarose-Gel erwies sich als ungeeignet und die im weiteren Verlauf eingebrachten Kupfer-Elektroden gingen Reaktionen mit dem umliegenden Gewebe und der Niere ein. Folglich war der zu erwartende elektrophoretische Effekt auf die Albumin-Moleküle im filtrierenden Glomerulus wahrscheinlich gering, falls überhaupt vorhanden. Zweitens ist die *unzureichende Diurese* als Kernproblematik im Versuch zu nennen. Sie schränkte die Proben-Gewinnung im Versuch erheblich ein und war hauptsächlich verantwortlich für die geringe Anzahl erfolgreich abgeschlossener Messungen. Selbst bei den wenigen vollständig durchgeführten Versuchen ist damit zu rechnen, dass der für die geringe Diurese verantwortliche Mechanismus relevanten Einfluss auf die physiologischen Vorgänge im Glomerulus bzw. die Gesamtfunktion des Organismus nahm. Folglich ist auch von einer Beeinträchtigung der im Versuch ermittelten Parameter auszugehen.

Um diesen Problemen zukünftig zu begegnen, sind verschiedene Modifikationen am Versuchsaufbau denkbar. Primär muss gewährleistet sein, dass tatsächlich ein *homogenes Feld* auf möglichst das gesamte Nierenparenchym einwirken kann. Dazu sollten zunächst weitere Eingriffe mit der hier etablierten Methode unter Verwendung *alternativen Elektrodenmaterials* durchgeführt werden. Vielversprechend erscheint dabei zunächst ein Austausch der unbeschichteten Kupferelektroden gegen eine Variante aus Edelstahl, bei der mit weit weniger lokaler Gewebsreaktion zu rechnen ist. Anschließend könnte der Spannungsabfall innerhalb der Niere etwa durch Einbringen mehrerer *Messsonden* in das Nierenparenchym hinein erfasst werden. Dies sollte einen besseren Eindruck von der elektrischen Situation innerhalb des Organs liefern. Zur weiteren Verwendung des Plexiglas-‘Löffels’, welcher die am besten kontrollierbare Messsituation ermöglichte, müsste zuvor unbedingt ein *alternativer Isolationsstoff* zum Bidest-Agar gefunden werden, um die Nie-

re darin einzubetten. Denkbar wären hier Produkte aus Silikon, wie sie in der Industrie als Füll- und Abdichtmasse zum Einsatz kommen (z.B. Materialien wie ELASTOSIL[®] von Wacker Silicones). Diese müssten neben der elektrischen Isolation auch die passende Viskosität aufweisen, um das Organ ringförmig ‘im Löffel’ zu umschließen. Zusätzlich ist auf optimale Blutversorgung während des Versuches zu achten, z.B. durch *Anpassen der Löffel-Konfiguration* im Bereich des Gefäßstiels. Zusammen mit der Evaluation des Feldes in der Niere gilt es, auch die auf das Organ aufgebrachte *Energiemenge* zu optimieren. Ist sichergestellt, dass innerhalb der Niere ausreichende Spannungen abfallen, um das wahrscheinlich nur 0,1- 0,5 mV kleine Strömungspotential [Hausmann et al., 2010] effektiv zu stören, ließe sich die außen angelegte Spannung drastisch reduzieren. Auf diese Weise würden Effekte durch Stromschäden an der Niere und den Elektroden minimiert und Auswirkungen des extrinsischen Störfeldes ließen sich leichter identifizieren.

Von solchen Modifikationen der in dieser Arbeit etablierten Methode abgesehen, könnte das intrinsische Feld der Niere auch in einem grundlegend anderen Versuchsaufbau untersucht werden: der *isoliert perfundierten Niere (IPN)*. Diese vor nunmehr 80 Jahren am Katzenmodell etablierte Methode [Macgregor & Peat, 1933] hat sich auch an der Ratte seit mehr als 40 Jahren bewährt [Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1967]. Auch heute leistet die Methode noch immer bei unzähligen Experimenten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Pharmakologie, Physiologie und Pathophysiologie der Niere [Georgiev et al., 2011] - darunter auch zur *glomerulären Filtrationsbarriere* [Venturoli & Rippe, 2005, Jeansson et al., 2006]. Für die Untersuchung des Strömungspotentials bietet besonders die *in vitro* IPN (also eine durch künstliches Perfusat versorgte Niere *außerhalb* des Tiersitus) maximale Kontroll- und Interventionsmöglichkeiten. So ermöglicht die IPN unter anderem die isolierte Betrachtung der glomerulären Filtration durch Ausschaltung des Tubulussystems mittels gekühltem Perfusat [Jeansson & Haraldsson, 2003] bzw. Blockierung der Tubuli mittels Glutaraldehyd-Fixierung [Ciarimboli et al., 2003]. Darüber hinaus ließe sich mit Hilfe der IPN das Kernproblem des Versuches, nämlich die ungenügende Diurese, mit hoher Wahrscheinlichkeit umgehen. Durch das artifizielle Perfusat und die Untersuchung in definierter, extrakorporaler Umgebung spielen *systemische Faktoren* des Versuchstieres (Blutdruck, humorale Effekte, Hypothermie etc.) bei den Messungen praktisch keine Rolle mehr. Diese Vorteile werden um den Preis erkauft, dass es sich bei der IPN um eine recht komplexe und ressourcenintensive Methode handelt, deren Resultate nicht einfach ‘eins zu eins’ auf die Abläufe *in vivo* übertragbar sind.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten bei der weiteren Untersuchung des intrinsischen Feldes der Niere. Mit den Erfahrungen aus den Versuchsreihen konnten wichtige Ansätze zu ihrer weiteren Verbesserung entwickelt werden. Die nächste logische Folgerung wäre nun die Umsetzung dieser Erkenntnisse in einem optimierten Versuchsaufbau bzw. ihr Transfer in eine andere Methode, wie die IPN.

6 Zusammenfassung

Die Funktionsweise der glomerulären Filtrationsbarriere ist trotz intensiver Forschung noch nicht abschließend verstanden. So gelangen im Laufe eines Menschenlebens über 300 Tonnen Plasmaproteine in den Filter - ohne dass dieser jemals verstopft. Hausmann et al. entwickelten ein Modell, das durch Berücksichtigung *elektrokinetischer Effekte* im Glomerulus einen Erklärungsansatz bietet. Danach entsteht filtrationsabhängig eine Potentialdifferenz (*Strömungspotential*) über dem Filter, die auf geladene Plasmabestandteile einwirkt. Per *Elektrophorese* befördert das Potential negativ geladene Moleküle (wie Albumin) - entgegen dem Druckgradienten - wieder zurück ins Blut, positiv geladene Bestandteile werden im Harn entsorgt: so bleibt der Filter lebenslang frei!

Mit dieser Arbeit sollte der Einfluss dieses Strömungspotentials *in vivo* am Modell der Ratte untersucht werden. Dazu konnte eine neue operative Methode etabliert werden, um ein elektrisches Feld über Elektroden direkt auf die Nierenoberfläche aufzubringen. Dieses extrinsische Feld sollte das Potential innerhalb der Niere stören und so dessen Einfluss auf die Filtereigenschaften der Barriere in Form vermehrter Proteinurie nachweisen. Die Messungen erfolgten intraoperativ am sedierten Versuchstier und mit seitengetrennter Entnahme von Urinproben direkt aus den Ureteren. Den Proben aus der Niere im elektrischen Feld stand damit zu jedem Zeitpunkt eine Versuchskontrolle aus der kontralateralen Niere gegenüber. Darüber hinaus ermöglichte ein zentralvenöser Zugang flexible Volumen- bzw. Medikamentenapplikation; ein arterieller Katheter gewährleistete die kontinuierliche invasive Kreislaufüberwachung der Versuchstiere.

Bei der Auswertung der Urinproben ließ sich der postulierte Zusammenhang von angelegter Spannung und vermehrter Proteinurie nicht nachweisen. Als mögliche Ursache wurde diskutiert, dass kein homogenes elektrisches Feld über dem gesamten Nierenparenchym aufgebaut werden konnte. Des Weiteren beeinträchtigten mehrere Faktoren die Nierenfunktion während der Eingriffe, sodass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls relevanten Einfluss auf die Proteinurie im Versuch nahmen.

Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit sind weitere Versuche notwendig, um das intrinsische Feld der Niere genauer zu beschreiben. Dabei sind Nachfolgeexperimente mit einer modifizierten Variante der hier etablierten Methode ebenso denkbar wie der Erfahrungstransfer in einen alternativen Versuchsaufbau. Vielversprechend erscheint für letztere Option insbesondere die weitere Untersuchung des Strömungspotentials mit Hilfe der *isoliert perfundierten Niere*. Die so beschriebene Vorgehensweise können helfen unser Verständnis vom glomerulären Filter weiter zu vertiefen.

7 Literaturverzeichnis

- [Badzyńska & Sadowski, 2011] **Badzyńska B., Sadowski J.:** Moderate intrarenal vasoconstriction after high pressor doses of norepinephrine in the rat: comparison with effects of angiotensin II. *Kidney & blood pressure research* (2011) 34(5):307–310
- [Boussarie, 2001] **Boussarie D.:** Routine sterilisation techniques in companion rodents and lagomorphs. *Eur J Compan Anim Pract* (2001) 11:61–78
- [Bowman, 1842] **Bowman W.:** On the Structure and Use of the Malpighian Bodies of the Kidney, with Observations on the Circulation through That Gland. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (1842) 132(0):57–80
- [Burtis et al., 2006] **Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E.:** *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Saunders, 4. Auflage (2006)
- [Ciarimboli et al., 2003] **Ciarimboli G., Hjalmarsson C., Bökenkamp A., Schurek H.J., Haraldsson B.:** Dynamic alterations of glomerular charge density in fixed rat kidneys suggest involvement of endothelial cell coat. *American journal of physiology. Renal physiology* (2003) 285(4):F722–30
- [Comper et al., 2008] **Comper W.D., Hilliard L.M., Nikolic-Paterson D.J., Russo L.M.:** Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *American journal of physiology. Renal physiology* (2008) 295(6):F1589–600
- [Cullen, 1999] **Cullen L.K.:** Xylazine and medetomidine in small animals: these drugs should be used carefully. *Australian veterinary journal* (1999) 77(11):722–723
- [Deckert et al., 1989] **Deckert T., Feldt-Rasmussen B., Borch-Johnsen K., Jensen T., Kofoed-Enevoldsen A.:** Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* (1989) 32(4):219–226
- [Deen et al., 1979] **Deen W.M., Bohrer M.P., Brenner B.M.:** Macromolecule transport across glomerular capillaries: application of pore theory. *Kidney international* (1979) 16(3):353–365
- [Deen et al., 2001] **Deen W.M., Lazzara M.J., Myers B.D.:** Structural determinants of glomerular permeability. *American journal of physiology. Renal physiology* (2001) 281(4):F579–96

- [Doherty, 1988] **Doherty T.J.:** Physiologic effects of alpha 2-adrenergic receptors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (1988) 192(11):1612–1614
- [Eppel et al., 2001] **Eppel G.A., Osicka T.M., Pratt L.M., Jablonski P., Howden B., Glasgow E.F., Comper W.D.:** The return of glomerular filtered albumin to the rat renal vein – the albumin retrieval pathway. *Renal failure* (2001) 23(3-4):347–363
- [Faes et al., 1999] **Faes T.J., van der Meij H.A., de Munck J.C., Heethaar R.M.:** The electric resistivity of human tissues (100 Hz-10 MHz): a meta-analysis of review studies. *Physiological measurement* (1999) 20(4):R1–10
- [Flecknell, 2009] **Flecknell P.:** *Laboratory Animal Anaesthesia*. Academic Press, 3. Auflage (2009)
- [Georgiev et al., 2011] **Georgiev T., Iliev R., Mihailova S., Hadzhibozheva P., Ilieva G., Kamburova M., Tolekova A.:** The isolated perfused kidney models - certain aspects. *Trakia Journal of Sciences* (2011) 9(3):82–87
- [Haraldsson et al., 2008] **Haraldsson B., Nystrom J., Deen W.M.:** Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. *Physiological Reviews* (2008) 88(2):451–487
- [Hausmann et al., 2012] **Hausmann R., Grepl M., Knecht V., Moeller M.J.:** The glomerular filtration barrier function: new concepts. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (2012) 21(4):441–449
- [Hausmann et al., 2010] **Hausmann R., Kuppe C., Egger H., Schweda F., Knecht V., Elger M., Menzel S., Somers D., Braun G., Fuss A., Uhlig S., Kriz W., Tanner G., Floege J., Moeller M.J.:** Electrical Forces Determine Glomerular Permeability. *Journal of the American Society of Nephrology* (2010) 21(12):2053–2058
- [Havel et al., 2011] **Havel C., Arrich J., Losert H., Gamper G., Müllner M., Herkner H.:** Vasopressors for hypotensive shock. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* (2011) (5):CD003709–CD003709
- [Huber & Benzing, 2005] **Huber T.B., Benzing T.:** The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (2005) 14(3):211–216
- [Jarad & Miner, 2009] **Jarad G., Miner J.H.:** Update on the glomerular filtration barrier. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (2009) 18(3):226–232
- [Jeansson et al., 2006] **Jeansson M., Granqvist A.B., Nyström J.S., Haraldsson B.:** Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice. *Diabetologia* (2006) 49(9):2200–2209

- [Jeansson & Haraldsson, 2003] **Jeansson M., Haraldsson B.:** Glomerular size and charge selectivity in the mouse after exposure to glucosaminoglycan-degrading enzymes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* (2003) 14(7):1756–1765
- [Kannel et al., 1984] **Kannel W.B., Stampfer M.J., Castelli W.P., Verter J.:** The prognostic significance of proteinuria: the Framingham study. *American heart journal* (1984) 108(5):1347–1352
- [Kestilä et al., 1998] **Kestilä M., Lenkkeri U., Männikkö M., Lamerdin J., McCready P., Putaala H., Ruotsalainen V., Morita T., Nissinen M., Herva R., Kashtan C.E., Peltonen L., Holmberg C., Olsen A., Tryggvason K.:** Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell* (1998) 1(4):575–582
- [Kobessho et al., 2008] **Kobessho H., Oishi K., Hamaguchi H., Kanda F.:** Elevation of cerebrospinal fluid protein in patients with diabetes mellitus is associated with duration of diabetes. *European neurology* (2008) 60(3):132–136
- [Ludwig, 1843] **Ludwig C.:** *Beiträge zur Lehre vom Mechanismus der Harnsekretion.* Verlag Elwert, Marburg (1843)
- [Lyklema, 1991] **Lyklema J.:** *Fundamentals of Interface and Colloid Science.* Academic Press, 1. Auflage (1991)
- [Macgregor & Peat, 1933] **Macgregor R.G., Peat S.:** The histamine-histaminase system in the isolated perfused kidney-lung preparation. *The Journal of physiology* (1933) 77(3):310–318
- [Mason & Hoyer, 2010] **Mason P.A., Hoyer P.F.:** Minimal change disease. In: *Comprehensive Clinical Nephrology*, Mosby, 4. Auflage (2010)
- [Matsushita et al., 2010] **Matsushita K., van der Velde M., Astor B.C., Woodward M., Levey A.S., de Jong P.E., Coresh J., Gansevoort R.T.:** Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* (2010) 375(9731):2073–2081
- [Me, 2001] **Me G.:** Tranquilizers, alpha2-Adrenergic Agonists and Related Agents. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Iowa State University Press, 8. Auflage (2001)
- [Menzel & Moeller, 2010] **Menzel S., Moeller M.J.:** Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatric Nephrology* (2010) 26(10):1775–1780
- [Moeller, 2010] **Moeller M.J.:** Neue Erkenntnisse zur glomerulären Struktur. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2010) 135(24):1232–1236

- [Moeller & Tenten, 2013] **Moeller M.J., Tenten V.:** Renal albumin filtration: alternative models to the standard physical barriers. *Nature reviews. Nephrology* (2013) 9(5):266–277
- [Mogensen, 1994] **Mogensen C.E.:** Systemic blood pressure and glomerular leakage with particular reference to diabetes and hypertension. *Journal of internal medicine* (1994) 235(4):297–316
- [Morrissey & Carpenter, 2004] **Morrissey J.K., Carpenter J.W.:** Formulary. In: *Ferrets, rabbits and rodents: clinical medicine and surgery*, Saunders, 2. Auflage (2004)
- [Nduka & Parrillo, 2009] **Nduka O.O., Parrillo J.E.:** The pathophysiology of septic shock. *Critical care clinics* (2009) 25(4):677–702– vii
- [Neal et al., 2007] **Neal C.R., Muston P.R., Njegovan D., Verrill R., Harper S.J., Deen W.M., Bates D.O.:** Glomerular filtration into the subpodocyte space is highly restricted under physiological perfusion conditions. *American journal of physiology. Renal physiology* (2007) 293(6):F1787–98
- [Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1967] **Nishiitsutsuji-Uwo J.M., Ross B.D., Krebs H.A.:** Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *The Biochemical journal* (1967) 103(3):852–862
- [Pass & Freeth, 1993] **Pass D., Freeth G.:** The rat. *ANZCCART News* (1993) 6(4):1–4
- [Peters, 1962] **Peters T.:** The biosynthesis of rat serum albumin. I. Properties of rat albumin and its occurrence in liver cell fractions. *The Journal of biological chemistry* (1962) 237:1181–1185
- [Pethig, 1987] **Pethig R.:** Dielectric properties of body tissues. *Clin. Phys. Physiol. Meas.* (1987) 8 Suppl A:5–12
- [Plumb, 1999] **Plumb D.C.:** *Veterinary Drug Handbook*. PharmaVet Publishing, 3. Auflage (1999)
- [Porter, 1972] **Porter M.C.:** Concentration Polarization with Membrane Ultrafiltration. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* (1972) 11(3):234–248
- [Rector et al., 1996] **Rector E., Otto K., Kietzmann M., Nolte I., Lehmacher W.:** [Pharmacokinetics and effects of xylazine (Rompun) in dogs]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* (1996) 109(1):18–22
- [Rhodin, 1955] **Rhodin J.:** Electron microscopy of the glomerular capillary wall. *Experimental cell research* (1955) 8(3):572–574

- [Rippe & Haraldsson, 1994] **Rippe B., Haraldsson B.:** Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiological Reviews* (1994) 74(1):163–219
- [Robinson et al., 1963] **Robinson R.R., Lecocq F.R., Phillippi P.J., Glenn W.G.:** Fixed and reproducible orthostatic proteinuria. III. Effect of induced renal hemodynamic alterations upon urinary protein excretion. *The Journal of clinical investigation* (1963) 42:100–110
- [Russo & Bressolle, 1998] **Russo H., Bressolle F.:** Pharmacodynamics and pharmacokinetics of thiopental. *Clinical pharmacokinetics* (1998) 35(2):95–134
- [Russo et al., 2007] **Russo L.M., Sandoval R.M., McKee M., Osicka T.M., Collins A.B., Brown D., Molitoris B.A., Comper W.D.:** The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney international* (2007) 71(6):504–513
- [Ryan & Karnovsky, 1976] **Ryan G.B., Karnovsky M.J.:** Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney international* (1976) 9(1):36–45
- [Schrier, 2008] **Schrier R.W.:** *Manual of Nephrology*. Lippincott Williams & Wilkins, 7. Auflage (2008)
- [Schwan & Kay, 1957] **Schwan H.P., Kay C.F.:** Capacitive Properties of Body Tissues. *Circulation Research* (1957) 5(4):439–443
- [Shea & Morrison, 1975] **Shea S.M., Morrison A.B.:** A stereological study of the glomerular filter in the rat. Morphometry of the slit diaphragm and basement membrane. *The Journal of cell biology* (1975) 67(2PT.1):436–443
- [Simpson, 2003] **Simpson R.J.:** *Proteins and Proteomics*. A Laboratory Manual, CSHL Press (2003)
- [Sinclair, 2003] **Sinclair M.D.:** A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* (2003) 44(11):885–897
- [Singh & Satchell, 2011] **Singh A., Satchell S.C.:** Microalbuminuria: causes and implications. *Pediatric Nephrology* (2011) 26(11):1957–1965
- [Smithies, 2003] **Smithies O.:** Why the kidney glomerulus does not clog: a gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2003) 100(7):4108–4113

- [Tanner, 2009] **Tanner G.A.:** Glomerular sieving coefficient of serum albumin in the rat: a two-photon microscopy study. *American journal of physiology. Renal physiology* (2009) 296(6):F1258–65
- [Thurmon et al., 1996] **Thurmon J.C., Tranquilli W.J., Benson G.J., Lumb W., Jones E.:** Preanesthetics and Anesthetic Adjuncts. In: *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*, Wiley, 3. Auflage (1996)
- [Tojo & Endou, 1992] **Tojo A., Endou H.:** Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *The American journal of physiology* (1992) 263(4 Pt 2):F601–6
- [Tranquilli et al., 1984] **Tranquilli W.J., Thurmon J.C., Corbin J.E., Benson G.J., Davis L.E.:** Halothane-sparing effect of xylazine in dogs and subsequent reversal with tolazoline. *J Vet Pharmacol Ther* (1984) 7(1):23–28
- [Tryggvason & Wartiovaara, 2005] **Tryggvason K., Wartiovaara J.:** How does the kidney filter plasma? *Physiology (Bethesda, Md.)* (2005) 20:96–101
- [Venturoli & Rippe, 2005] **Venturoli D., Rippe B.:** Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *American journal of physiology. Renal physiology* (2005) 288(4):F605–13
- [Virtanen et al., 1988] **Virtanen R., Savola J.M., Saano V., Nyman L.:** Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* (1988) 150(1-2):9–14
- [Volpe et al., 2003] **Volpe M., Cosentino F., Ruilope L.M.:** Is it time to measure microalbuminuria in hypertension? *Journal of hypertension* (2003) 21(7):1213–1220
- [Wijnbergen, 2005] **Wijnbergen A.:** Ratten. In: *Krankheiten der Heimtiere*, Schlütersche Verlagsgesellschaft, 3. Auflage (2005)
- [Wolgast et al., 1996] **Wolgast M., Källskog O., Wahlström H.:** Characteristics of the glomerular capillary membrane of the rat kidney as a hydrated gel. II. On the validity of the model. *Acta physiologica Scandinavica* (1996) 158(3):225–232
- [Wolgast & Persson, 2011] **Wolgast M., Persson A.E.G.:** The gel hypothesis applied to the rat renal capillary membranes - a review. *Acta Physiologica* (2011) 202(4):617–628
- [World Health Organization, 2012] **World Health Organization:** European mortality database (MDB). URL: <http://data.euro.who.int/hfamdb/> (2012)

[Yamashita et al., 2000] **Yamashita K., Tsubakishita S., Futaok S., Ueda I., Hamaguchi H., Seno T., Katoh S., Izumisawa Y., Kotani T., Muir W.W.:** Cardiovascular effects of medetomidine, detomidine and xylazine in horses. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* (2000) 62(10):1025–1032

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Floege, Direktor der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums Aachen, für die Möglichkeit, in seiner Klinik promovieren und die Ausstattung und Räume der Klinik nutzen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Marcus Möller, Oberarzt der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums Aachen, für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung in allen Phasen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Hausmann, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Aachen, für die umfassende Unterstützung beim Erlernen der grundlegenden Operationsmethoden sowie für die engagierte Beratung in vielen fachlichen Fragen.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Dr.-Ing. Christoph Roggendorf, ehemaliger Abteilungsleiter im Institut für Hochspannungstechnik der RWTH Aachen, für die geduldige Beratung und Hilfestellung in elektrotechnischen Fragen sowie für die Agarose-Untersuchung.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Möller für die stets kollegial-freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen kleinen Ratschläge und Hinweise, die mir den Weg zu dieser Arbeit oft geebnet haben.

Ich danke auch dem Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen für die Haltung der Versuchstiere und die laborchemische Probenanalyse.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Aachen für die Bereitstellung seiner Räume und Ausstattung.

In gleicher Weise möchte ich dem Institut für Hochspannungstechnik der RWTH Aachen für die Bereitstellung seiner Räume und Ausstattung danken.

9 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Lukas Hendrik Esch, Küdinghovener Str. 115, 53227 Bonn, hinterlegt sind.

10 Erklärung über den Eigenanteil

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Herr Lukas Hendrik Esch, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Der Einfluss extrazellulärer Strömungspotentiale auf die glomeruläre Filtration - eine Untersuchung am Modell der Ratte“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente, sowie deren statistische Auswertung.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

- Herr Prof. Dr. med. Marcus Möller - Diskussion inhaltlicher Fragen, Korrektur der Dissertation
- Herr Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Hausmann - Unterweisung in OP-Techniken, Diskussion inhaltlicher Fragen
- Herr Dr.-Ing. Christoph Roggendorf - Beratung in elektrotechnischen Fragen, elektrotechnische Agarose-Untersuchung
- Institut für Versuchstierkunde - Haltung der Versuchstiere, laborchemische Probenanalyse

Lukas Hendrik Esch

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Lukas Hendrik Esch.

Prof. Dr. med. Marcus Möller

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Esch
Vorname	Lukas Hendrik
Geburtsdatum	27.11.1985
Geburtsort	Bonn
Familienstand	ledig

Schulbildung und Studium

06/2005	Abitur am Kardinal-Frings-Gymnasium, Bonn (Note: 1,3)
10/2006 – 10/2012	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
09/2009	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: „sehr gut“)
10/2012	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: „sehr gut“)
08/2011 – 07/2012	Praktisches Jahr: Royal Brisbane and Women’s Hospital und Mount Sinai Hospital (Chirurgie), Kantonsspital Luzern (Innere Medizin), Universitätsklinikum Aachen (Wahlfach: Urologie)
01/2013	Approbation als Arzt

Auslandsaufenthalte

08/2002 – 12/2002	Coláiste Chríost Rí, Cork, Irland
01/2010 – 06/2010	Studium der Humanmedizin an der NTNU Trondheim, Norwegen
08/2011 – 10/2011	Royal Brisbane and Women’s Hospital, Australien
10/2011 – 12/2011	Mount Sinai Hospital, New York City, USA
12/2011 – 03/2012	Kantonsspital Luzern, Schweiz

Beruf

03/2013 – heute	Assistenzarzt in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Prof. Albers)
-----------------	--