

**Die endotheliale Glykokalyx als essentieller Bestandteil
der glomerulären Filtrationsbarriere:
Eine intravitale Multiphotonenmikroskopie-Studie**

von Carla Wiebke Gerhard

Inauguraldissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Die endotheliale Glykokalyx als essentieller Bestandteil der
glomerulären Filtrationsbarriere:
Eine intravitale Multiphotonenmikroskopie-Studie**

von Carla Wiebke Gerhard
aus Nürnberg

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg
Mentor: Univ.-Prof. Dr. H. Castrop

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 27.Juli 2019

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Niere	1
1.1.1	Funktion und Morphologie	1
1.1.2	Die glomeruläre Filtrationsbarriere	1
1.2	Pathophysiologie der Proteinurie	3
1.2.1	Definition und Ursachen	3
1.2.2	Klinische Bedeutung	4
1.3	Tubulo-glomerulärer Feedbackmechanismus	5
1.4	Endotheliale Glykokalyx	6
1.4.1	Historie und Visualisierungsmöglichkeiten	6
1.4.2	Aufbau und Bestandteile	7
1.4.3	Funktion	8
1.4.3.1	Revidiertes Prinzip der Starlinggleichung	8
1.4.3.2	Ladung der endothelialen Glykokalyx	9
1.4.3.3	Mechanotransduktion durch die endotheliale Glykokalyx	9
1.4.3.4	Zellinteraktion mit Blutbestandteilen	10
1.4.3.5	Blutgerinnung und fibrinolytisches System	11
1.4.4	Shedding der endothelialen Glykokalyx	11
1.4.5	Substanzen mit protektiver Wirkung auf die endotheliale Glykokalyx	12
1.4.6	Bedeutung für die glomeruläre Filtrationsbarriere	13
1.5	Grundlagen der Multiphotonenmikroskopie	13
1.5.1	Prinzip der Multiphotonenmikroskopie	14
1.5.2	Vorteile gegenüber der konventionellen Einphotonenmikroskopie	14
2	Fragestellung	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Geräte	18
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3	Chemikalien und Pharmazeutika	19
3.2	Methoden	20
3.2.1	Versuchstiere	20
3.2.1.1	Munich Wistar Froemter Ratten	20
3.2.1.2	Mäuse	20
3.2.2	Haltung der Versuchstiere	21

3.2.3	Vorbereitung der Versuchstiere und Voraussetzungen für die mikroskopische Untersuchung	21
3.2.4	Bestimmung funktioneller Parameter der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie.....	22
3.2.4.1	Glomerulärer Siebkoeffizient für Albumin	22
3.2.4.2	Glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons.....	24
3.2.5	Visualisierung der endothelialen Glykokalyx mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie.....	25
3.2.6	Histologische Methoden.....	26
3.2.6.1	Retrograde arterielle Perfusionsfixierung der Nieren	26
3.2.6.2	Einbetten in Paraffin und Anfertigung von Nierenschnitten.....	27
3.2.6.3	Immunfluoreszenzfärbung	27
3.2.6.4	Untersuchung der Nierenschnitte am Multiphotonenmikroskop.....	27
3.2.7	Nachweis von Syndekan1, Heparansulfat und Hyaluronsäure.....	28
3.2.7.1	Urin- und Plasmagewinnung	28
3.2.7.2	ELISA	28
3.2.8	Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin.....	29
3.2.9	Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
3.2.10	Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin	30
3.2.11	Zellkultur.....	30
3.2.12	Statistische Auswertung	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.....	32
4.1.1	Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Siebkoeffizienten für Albumin	32
4.1.2	Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Filtrationsrate des Einzelneurons	34
4.1.3	Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Durchmesser des proximalen Tubulus	35
4.1.4	Auswirkung einer akuten Tubulusnekrose auf die endotheliale Glykokalyx.....	36
4.2	Calciumbasierte Zell-Zell-Kommunikation im tubulären System	38
4.3	Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.....	39
4.3.1	Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf den Siebkoeffizienten für Albumin	39
4.3.2	Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Proteinausscheidung im Urin.....	40
4.3.3	Proteindifferenzierung im Urin nach Verabreichung des Enzyms Hyaluronidase	41
4.3.4	Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Albuminausscheidung im Urin	42
4.4	Auswirkungen einer klinisch manifesten Proteinurie auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	43
4.4.1	Verlauf der Proteinausscheidung im Urin von MWF Ratten mit zunehmendem Alter	43

4.4.2	Auswirkungen einer klinisch manifesten Proteinurie auf die endotheliale Glykokalyx.....	44
4.4.3	Wistar Ratten als nicht proteinurisches Modell	45
4.5	Auswirkungen eines Hypertonus auf die glomeruläre Filtrationsbarriere, insbesondere auf die endotheliale Glykokalyx.....	47
4.5.1	Auswirkungen von Angiotensin II auf die Proteinausscheidung im Urin	47
4.5.2	Proteindifferenzierung im Urin nach Angiotensin II-Infusion	48
4.5.3	Auswirkungen von Angiotensin II auf die Albuminausscheidung im Urin.....	49
4.5.4	Auswirkungen von Angiotensin II auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx.....	49
4.5.5	Auswirkungen von Noradrenalin auf die glomeruläre Filtrationsbarriere	51
4.5.5.1	Auswirkungen von Noradrenalin auf den Siebkoeffizienten für Albumin.....	51
4.5.5.2	Auswirkungen von Noradrenalin auf die Proteinausscheidung im Urin	52
4.5.5.3	Proteindifferenzierung im Urin nach Noradrenalin-Infusion	53
4.5.5.4	Auswirkungen von Noradrenalin auf die Albuminausscheidung im Urin	54
4.5.5.5	Auswirkungen von Noradrenalin auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	54
4.6	Einfluss auf die verschiedenen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx durch Hyaluronidase, Angiotensin II und Noradrenalin	56
4.6.1	Syndekan1	57
4.6.1.1	Urin	57
4.6.1.2	Plasma.....	58
4.6.2	Heparansulfat im Urin	59
4.6.3	Hyaluronsäure	60
4.6.3.1	Urin	60
4.6.3.2	Plasma.....	61
4.7	Beeinflussung der endothelialen Glykokalyx in vitro	62
4.7.1	Kurzzeitversuche.....	63
4.7.2	Langzeitversuche	64
5	Diskussion	65
5.1	Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.....	65
5.2	Mögliche Mechanismen der tubulo-glomerulären Kommunikation.....	67
5.2.1	Macula-densa-Zellen als Vermittler der tubulo-glomerulären Kommunikation.....	68
5.2.2	Zell-Zell-Kommunikation im tubulären System	68
5.3	Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.....	69
5.4	Korrelation zwischen einer klinisch manifesten Proteinurie und der Dichte der endothelialen Glykokalyx	70
5.5	Auswirkungen eines Hypertonus auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.....	71
5.6	Beeinflussung der verschiedenen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx durch Hyaluronidase, Angiotensin II und Noradrenalin	73

5.7	Untersuchung der endothelialen Glykokalyx in vitro	75
6	Zusammenfassung	77
7	Summary	79
8	Literaturverzeichnis	81
9	Anhang	88
9.1	Abbildungsverzeichnis	88
9.2	Abkürzungsverzeichnis	90
9.3	Kongressbeiträge	91
10	Danksagung	93

1 Einleitung

1.1 Die Niere

1.1.1 Funktion und Morphologie

Die Nieren sind paarig angelegte Organe, die retroperitoneal in der Bauchhöhle liegen und von einer festen aus Bindegewebe bestehenden Kapsel umgeben sind. Sie übernehmen bei Wirbeltieren zahlreiche lebenswichtige Aufgaben. Die Nieren sind für die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen wie Harnstoff und Kreatinin verantwortlich. Des Weiteren zählen die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie die Säure/Basen-Homöostase zu ihren Aufgaben. Über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sind die Nieren dazu in der Lage, den Blutdruck zu regulieren. Zudem werden in der Niere Hormone wie Calcitriol, Erythropoetin und Renin synthetisiert, die Einfluss auf die Blutbildung und den Knochenstoffwechsel haben.

Das Nierengewebe gliedert sich in die äußere Rinde (Cortex), das innere Mark (Medulla) und das Nierenbecken (Pelvis).

Die kleinste funktionelle Einheit der Nieren ist das Nephron. Das Nephron setzt sich aus dem Nierenkörperchen (Glomerulus) und dem dort entspringenden Tubulussystem zusammen. Das Nierenkörperchen besteht aus einem Kapillarknäuel, das von der Bowman Kapsel umgeben ist und fungiert als glomeruläre Filtrationsschranke. Hier findet die Blutfiltration und Bildung des Primärharns statt.

Der zweite Teil des Nephrons, der Tubulusapparat, konzentriert den Primärharn und ändert dessen chemische Zusammensetzung durch Reabsorptions- und Sekretionsvorgänge.

Der Tubulusapparat, bestehend aus einem stark gewundenen proximalen Tubulus, der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus, endet im Verbindungsstück. Das Verbindungsstück führt in das Sammelrohr, das schließlich in das Nierenbecken mündet. Von hier aus fließt der Harn über den Ureter in die Harnblase.

(Arnold 2015; Deetjen und Alzheimer 2005; Klinker et al. 2005; Pape et al. 2018)

1.1.2 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die glomeruläre Filtrationsbarriere ist eine komplexe, hoch spezialisierte Barriere, die maßgeblich dafür verantwortlich ist, welche Moleküle aus dem Blut in den Primärharn filtriert werden (Menon et al. 2012). Sie setzt sich aus drei Schichten zusammen (Jarad und Miner 2009): Dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und dem

viszeralem Blatt der Bowman Kapsel, das von den Podozyten gebildet wird. Die erste Schicht des glomerulären Filters, das Endothel, das die Blutgefäße luminal auskleidet, wirkt sowohl größen- als auch ladungsselektiv. Die Interzellularräume der Endothelzellen sind etwa 60 nm groß. Folglich können nur Moleküle, die kleiner als 60 nm sind, diese erste Barriere überwinden. Luminal sind die Endothelzellen von einer negativ geladenen Schicht, der endothelialen Glykokalyx überzogen, auf die in der folgenden Arbeit im Detail eingegangen wird. Die endotheliale Glykokalyx leistet einen großen Beitrag zur Ladungsselektivität der glomerulären Filtrationsbarriere. Versuche zeigten, dass das negativ geladene Albumin in weitaus geringerem Umfang filtriert wird als neutrale Moleküle der gleichen Größe (Haraldsson et al. 2008). Dies verdeutlicht, dass neben der Größe auch die Ladung der Moleküle im Hinblick auf ihre Filtration entscheidend ist. Die glomeruläre Basalmembran, die sich in drei Schichten unterteilen lässt, verbindet das Glomerulusendothel mit Hilfe von Adhäsionsproteinen mit dem viszeralem Blatt der Bowman Kapsel. Sie setzt sich aus einem Netzwerk aus KollagenIV, Nidogen, Laminin und Proteoglykanen zusammen. Mit einer Dicke von 240 bis 340 nm stellt sie eine mechanische Komponente des Filters dar (Miner 2012). Das viszerale Blatt der Bowman Kapsel wird von den Podozyten gebildet. Bei Podozyten handelt es sich um hoch differenzierte und spezialisierte Zellen. Sie bestehen aus einem voluminösen Zellkörper, von dem Primärfortsätze ausstrahlen, die sich weiter in feinere, sogenannte Sekundärfortsätze aufzweigen. Die sekundären Fußfortsätze benachbarter Podozyten verzahnen sich fingerartig ineinander. Zwischen den einzelnen Fortsätzen befinden sich 30 bis 40 nm breite Filtrationsschlitze, die von einer Schlitzmembran überbrückt werden, die hauptsächlich aus den Proteinen Podocin und Nephrin besteht (Arif und Nihalani 2013; Greka und Mundel 2012; Pavenstädt et al. 2003).

Kommt es aufgrund von diversen Erkrankungen zu einer Porenvergrößerung oder zu einem Verlust der negativen Ladungseigenschaft, können Proteine ungehindert die Membran passieren und es kommt zu einer Proteinurie, in Form einer Albuminurie.

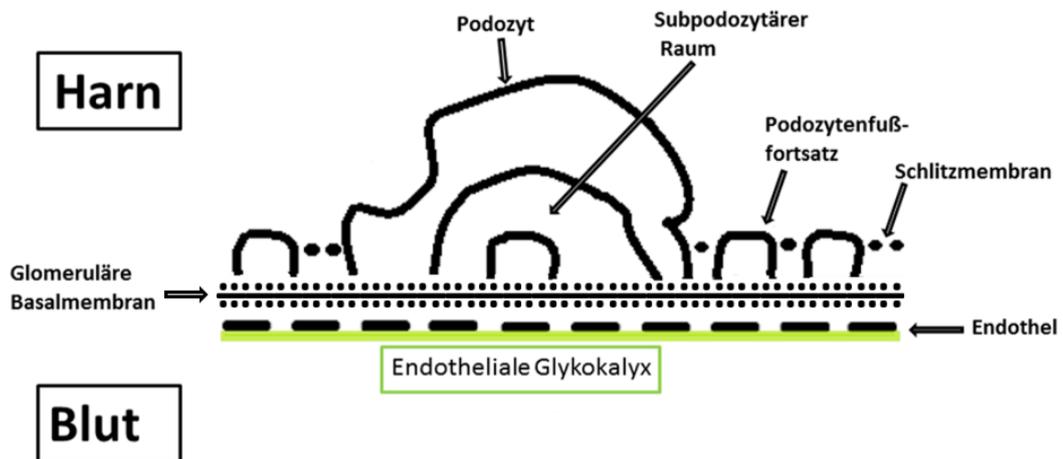


Abbildung 1: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere

1.2 Pathophysiologie der Proteinurie

1.2.1 Definition und Ursachen

In der Humanmedizin ist eine Proteinurie durch die Ausscheidung von mehr als 150 mg Eiweiß pro Tag über den Urin gekennzeichnet (Greten et al. 2010). Da der glomeruläre Filter für größere Proteine wie das quantitativ wichtigste Plasmaprotein Albumin weitgehend undurchlässig ist, beträgt die Konzentration im Filtrat nur 0,01-0,05% der Konzentration, die im Plasma vorliegt (Klinke et al. 2005). Überschreitet die Albuminausscheidung 30 mg/d wird dies als Mikroalbuminurie bezeichnet. Wird eine Albuminausscheidung von mehr als 300 mg/d im Urin gemessen, nennt man dies Makroalbuminurie.

Die Entstehung einer Proteinurie kann verschiedene Ursachen haben. Je nach Entstehungsort wird zwischen einer prärenalen, renalen oder postrenalen Proteinurie differenziert. Die prärenale Proteinurie, auch Überlaufproteinurie genannt, kommt durch eine krankhafte Proteinerhöhung im Plasma zustande. Die renale Proteinurie lässt sich in die glomeruläre und die tubuläre Proteinurie unterteilen. Bei einer glomerulären Proteinurie liegt eine Schädigung des glomerulären Filters vor, sodass hohe Mengen an Proteinen ins Filtrat gelangen. Eine weitere Unterteilung der glomerulären Proteinurie in einen selektiven und unselektiven Zustand des Permeabilitätsdefekts ist durch die Bestimmung von Albumin und ImmunglobulinG (IgG) möglich. Durch die Auflagerung von Immunkomplexen kann es zu einer Neutralisation der anionischen Ladung der Filtrationsbarriere kommen. Dies hat zur Folge, dass

die Ladungsselektivität für negativ geladene Moleküle wie Albumin aufgehoben ist und diese den Filter vermehrt passieren können. Bei einem Verlust der negativen Ladungsträger des glomerulären Filters spricht man von einer selektiven glomerulären Proteinurie, für die Albumin als vermehrtes Markerprotein gilt. Wird aufgrund von strukturellen Schädigungen neben der Ladungsselektivität auch die Größenselektivität beeinträchtigt, spricht man von einer unselektiven glomerulären Proteinurie, bei der neben Albumin auch großmolekulare Proteine wie IgG mit dem Harn ausgeschieden werden (Schütz 2000; Kawakami et al. 1990).

Die glomeruläre Proteinurie, bei der es zu einer pathologisch vermehrten Proteinfiltration über die glomeruläre Filtrationsbarriere kommt, wird als die Hauptursache für die Entstehung einer klinisch manifesten Proteinurie gesehen (Haraldsson et al. 2008).

Bei einer tubulären Proteinurie ist die Fähigkeit des proximalen Tubulus zur Reabsorption reduziert. Dies kann zum Beispiel durch Schädigungen der Tubuluszellen durch Nephrotoxine, entzündliche Prozesse oder auch die Erschöpfung der physiologischen Reabsorptionsmechanismen bedingt sein (Schütz 2000). Sind die Zellen des proximalen Tubulus geschädigt, können auch physiologische Proteinmengen im Ultrafiltrat nicht mehr ausreichend reabsorbiert werden und werden folglich mit dem Urin ausgeschieden (Klinke et al. 2005). Von einer postrenalen Proteinurie spricht man, wenn die Proteine im Harn nicht aus der Niere stammen, sondern über die abführenden Harnwege in den Urin gelangen.

1.2.2 Klinische Bedeutung

Bei zahlreichen Nierenerkrankungen tritt häufig eine Proteinurie auf. Eine Proteinurie ist unter anderem ein Hinweis auf einen Integritätsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere (Castrop und Schießl 2017). Dabei scheint eine pathologisch erhöhte Proteinausscheidung im Urin nicht nur ein Kennzeichen verschiedener Nierenerkrankungen zu sein, sondern auch den Verlauf einer Nierenfunktionsstörung zu beschleunigen (Remuzzi und Bertani 1998). Proteinurie wird unter anderem mit dem Auftreten von chronischen Nierenerkrankungen assoziiert. Chronische Nierenerkrankungen gelten als Risikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, die eine hohe Mortalitätsrate aufweisen (Keith et al. 2004). Zudem führt eine Proteinurie zu einer Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), der relevantesten Kenngröße der Nierenfunktion (Currie und Delles 2013) und somit zu einer verschlechterten Klärfunktion der Nieren. Unter physiologischen Bedingungen reabsorbieren proximale Tubuluszellen mittels Endozytose Proteine, die bereits den glomerulären Filter passiert haben. Kommt es allerdings zu einer erhöhten Proteinfiltration, wird die

physiologische Reabsorptionsfähigkeit des proximalen Tubulus überschritten und es kommt zu einer Akkumulation der proteinhaltigen Lysosomen im proximalen Tubulus, was wiederum zu einer Schädigung der betroffenen Tubuluszellen führt (Dickson et al. 2014). Des Weiteren wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass das Schlaganfallrisiko bei Patienten mit erhöhter Albuminausscheidung im Vergleich zu Patienten mit einer physiologischen Albuminausscheidung um 90% gesteigert war (Lee et al. 2010).

Außerdem führt die Kombination von Mikroalbuminurie vor allem im Zusammenhang mit dem sogenannten metabolischen Syndrom zu weiteren Problemen. Das metabolische Syndrom, auch als tödliches Quartett bezeichnet, ist der Überbegriff für Risikofaktoren arterieller Gefäßerkrankungen, insbesondere für Erkrankungen der Koronargefäße. Die Risikofaktoren sind neben Hypertonie und abdominaler Fettleibigkeit auch Insulinresistenz und Störungen im Fettstoffwechsel. Verglichen mit hypertonen Patienten mit physiologischer Albuminausscheidung unterliegen Patienten, die neben dem Bluthochdruck auch an einer Mikroalbuminurie leiden, einem 4-fach erhöhten Risiko eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln (Jensen et al. 2000). Albumin dient als wichtigstes Plasmaprotein der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks. Ein Albuminmangel lässt den onkotischen Druck im Blutplasma sinken und es kommt zu einer vermehrten Filtration von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe, was mit der Entstehung von Ödemen einhergeht (Siddall und Radhakrishnan 2012).

Um das Risiko eines progressiven Verlaufs von chronischen Nierenerkrankungen, einer verminderten GFR und vor allem des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen zu reduzieren, ist es wichtig, die Proteinurie frühzeitig zu erkennen und zu therapieren, um die Erhaltung der Nierenfunktion zu gewährleisten.

1.3 Tubulo-glomerulärer Feedbackmechanismus

Wie gerade beschrieben stellt die Proteinurie einen Risikofaktor für den Verlauf von chronischen Nierenerkrankungen und einer verminderten GFR dar. Deshalb wird im Folgenden auf den tubulo-glomerulären Feedbackmechanismus (TGF), einen Mechanismus, der die GFR regulieren und eine Hyperfiltration der glomerulären Filtrationsbarriere verhindern soll, genauer eingegangen. Der tubulo-glomeruläre Feedbackmechanismus reguliert die Filtration einzelner Nephrone in der Niere, indem er die GFR der tubulären Resorption anpasst. Die anatomische Voraussetzung für diesen Mechanismus ist der Kontakt der in der Wand des distalen Tubulus gelegenen Macula-densa-Zellen mit dem zugehörigen Glomerulus im Bereich des juxtaglomerulären Apparats. Macula-densa-Zellen sind eine Population von spezialisierten

Tubuluszellen, die in Abhängigkeit von der Natriumchlorid (NaCl)-Konzentration im Tubulus den Tonus der afferenten Arteriole und damit die GFR des jeweiligen Nephrons modulieren. Im Falle einer erhöhten tubulären NaCl-Konzentration wird diese von furosemidsensitiven Na/K/2Cl-Kotransportern in den Macula-densa-Zellen detektiert. Dies führt zu einer Zunahme der intrazellulären Cl-Konzentration und im Folgenden zu einer Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP), das zu Adenosin dephosphoryliert wird. Adenosin bewirkt eine Vasokonstriktion des Vas afferens, die eine Abnahme der Einzelnephron-GFR zur Folge hat. Damit wird die notwendige Reabsorptionsarbeit für dieses Nephron reduziert und die NaCl-Konzentration im frühdistalen Tubulus sinkt ab. Eine erniedrigte NaCl-Konzentration führt zu einem umgekehrten Effekt. Durch diesen Feedbackmechanismus werden sowohl die Autoregulation der renalen Perfusion als auch eine konstante GFR gewährleistet. Er schützt die glomerulären Kapillaren vor einer übermäßigen Druckbelastung, die Filtrationsbarriere vor einer Hyperfiltration und das Tubulussystem vor einer inadäquaten Reabsorption von Proteinen.

(Castrop 2016; Klinker et al. 2005; Deetjen und Alzheimer 2005)

1.4 Endotheliale Glykokalyx

Die endotheliale Glykokalyx ist ein Teil der glomerulären Filtrationsbarriere. Da sie seit einiger Zeit immer mehr in den Fokus der Wissenschaft rückt und auch in der vorliegenden Arbeit intensiv untersucht werden sollte, werden im Folgenden ihr Aufbau, ihre Funktion und ihre Bedeutung für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere dargestellt.

1.4.1 Historie und Visualisierungsmöglichkeiten

Bereits im Jahre 1947 wurde vermutet, dass auf der luminalen Seite der Endothelzelle eine schmale zellfreie Schicht existiert (Chambers und Zweifach 1947; Danielli 1940).

Mittels der Rutheniumrot-Kontrastierung konnte die als endotheliale Glykokalyx bezeichnete Schicht im Jahre 1966 erstmals mit Hilfe der Elektronenmikroskopie dargestellt werden. Luft beschrieb sie als eine unregelmäßig geformte, flockige Schicht mit einer Dicke von 20 nm (Luft 1966). Dieser Schicht wurde jedoch aufgrund der geringen Dicke lange Zeit keine große funktionelle Bedeutung zugeschrieben.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass diese Schicht wesentlich dicker ist als bis dahin angenommen wurde (Barker et al. 2004a).

Heute ist die endotheliale Glykokalyx mit Hilfe der Intravitalmikroskopie gut zu visualisieren und spielt eine große Rolle bei verschiedenen Erkrankungen und Therapieansätzen.

1.4.2 Aufbau und Bestandteile

Die endotheliale Glykokalyx, eine kohlenhydratreiche Schicht, kleidet luminal jedes gesunde Blutgefäß des Kreislaufsystems aus. Das Fundament der endothelialen Glykokalyx bilden die Proteoglykane, wobei das transmembranär verankerte Syndekan1 den Hauptbestandteil darstellt (Carey 1997).

In Verbindung mit diesem Fundament bilden die daran befestigten Glykosaminoglykane das Grundgerüst der endothelialen Glykokalyx. Es sind fünf verschiedene Glykosaminoglykane vertreten: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure. Heparansulfat bildet mit einem Anteil von 90% die Hauptfraktion der Glykosaminoglykane. Die Hyaluronsäure ist das einzige Glykosaminoglykan, das nicht über ein Proteoglykan, sondern über den CD44 Rezeptor an die Zellmembran gebunden ist. Aufgrund der negativen Ladung der Seitenketten der Glykosaminoglykane entsteht eine negativ geladene Schicht entlang der Endothelzellen. Die Gruppe der Glykoproteine, die ebenfalls einen Teil des Grundgerüsts der endothelialen Glykokalyx darstellt, ist durch kurze verzweigte Kohlenhydratseitenketten charakterisiert (Reitsma et al. 2007).

Zusammen mit dem Grundgerüst bildet die sogenannte „Dynamische Komponente“ die Endothelial Surface Layer (ESL). Die dynamische Komponente besteht aus löslichen Anteilen, die entweder vom Endothel oder aus dem Blutstrom stammen. Die löslichen Bestandteile aus dem Blutstrom werden an das Grundgerüst angelagert, vernetzt und wieder losgelöst. Bedingt durch das dynamische Gleichgewicht zwischen dem Grundgerüst und den Plasmateilchen variiert die Dichte und Struktur der ESL (Pries et al. 2000).

Die Dicke der endothelialen Glykokalyx hängt davon ab, welches Blutgefäß sie auskleidet. In Experimenten mit Ratten konnte dargestellt werden, dass die Dicke der endothelialen Glykokalyx in Kapillaren 0,2-0,5 μm (van den Berg et al. 2003) und in kleinen Arterien 2-3 μm (van Haaren et al. 2003) beträgt. In murinen Karotiden beträgt ihre Dicke 4,5 μm (Megens et al. 2007).

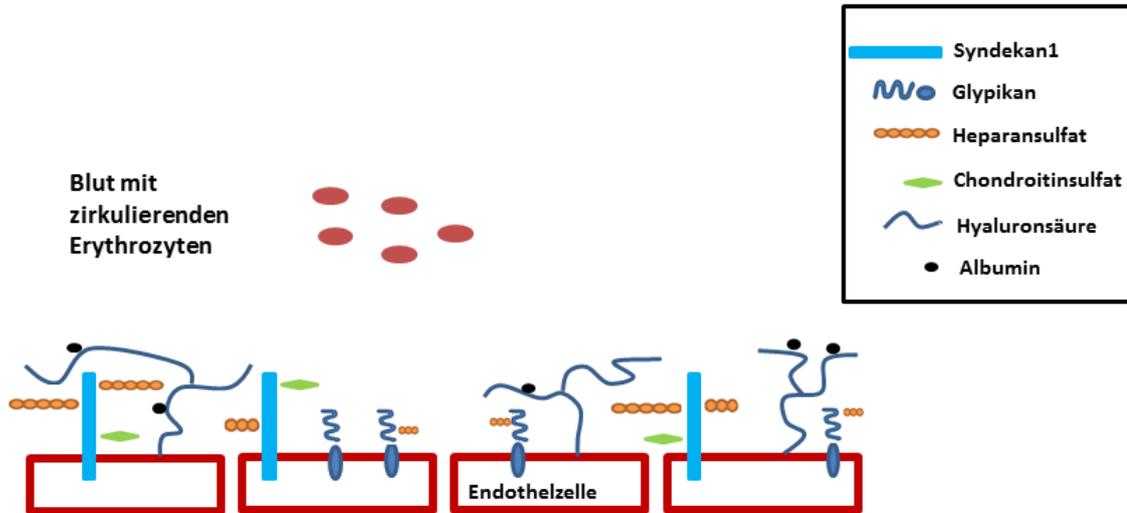


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx

1.4.3 Funktion

1.4.3.1 Revidiertes Prinzip der Starlinggleichung

Im Jahre 1896 hat Ernest Starling folgende Gleichung für die Filtrationskraft (F), die über das Endothel wirkt, aufgestellt: $F = (P_c - P_i) - \sigma(\pi_p - \pi_i)$ (Starling 1896).

Diese Gleichung beschreibt den Nettofluss über eine kapilläre Membran, der durch hydrostatische und onkotische Kräfte verursacht wird. Sowohl durch den onkotischen Druck in den Kapillaren (π_p) als auch durch den hydrostatischen Druck im Interstitium (P_i) werden Kolloide und Flüssigkeit im Gefäß gehalten. Dem entgegengesetzt wirkt der niedrigere hydrostatische Druck in den Kapillaren (P_c) und der onkotische Druck im Interstitium (π_i). Die Gefäßpermeabilität für Kolloidmoleküle wird durch den Reflexionskoeffizienten σ berücksichtigt. Hier ist zu erwähnen, dass die endotheliale Glykokalyx bis dato noch völlig unbekannt war und nicht in der Gleichung berücksichtigt wurde.

In den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts wurde festgestellt, dass die Konzentration der Kolloide im Interstitium nicht, wie ursprünglich von Ernest Starling angenommen, wesentlich geringer als im Plasma ist. Aufgrund dieser Gegebenheit formulierte Levick 1991 das sogenannte „low lymph flow paradoxon“ (Levick 1991). Dies basiert auf der Beobachtung, dass viele Gewebe nicht in Balance wären, wenn der nach innen gerichtete onkotische Gradient der einzige Faktor wäre, der der vom hydrostatischen Druck abhängige Auswärtsfiltration

entgegenwirken würde (Jacob und Chappell 2013). Die Kapazität des Lymphsystems würde bei solch einer Nettofiltration ins Interstitium bei Weitem überschritten werden.

Im Jahr 2004 wurde die Starlinggleichung zu einer neuen Formel revidiert, in der sich der kolloidosmotische Gradient nicht mehr auf das Interstitium, sondern auf den schmalen Spalt (g) zwischen der endothelialen Glykokalyx und der Endothelzelloberfläche bezieht (Adamson et al. 2004).

$$F=(P_c-P_g)-\sigma(\pi_p-\pi_g)$$

Im selben Jahr wurde das „Double Barrier“ Konzept veröffentlicht (Rehm et al. 2004). Sowohl die endotheliale Glykokalyx als auch die Endothelzelle selbst wirken einer Kolloidauwärtsfiltration entgegen.

1.4.3.2 Ladung der endothelialen Glykokalyx

Die endotheliale Glykokalyx ist aufgrund der negativ geladenen Seitenketten der Glykosaminoglykane insgesamt negativ geladen. Sie ist je nach Ladung und Größe der Blutbestandteile unterschiedlich permeabel. Im Detail wird später noch genauer auf die endotheliale Glykokalyx und deren physiologische Bedeutung in den glomerulären Kapillaren, besonders im Hinblick auf die glomeruläre Filtrationsbarriere eingegangen. Nachdem im Modell eine Ladungsneutralisation der ESL erzeugt wurde, konnte ein vermehrter Durchtritt von Albumin und Dextran gemessen werden. Damit wurde demonstriert, dass die Permeabilität maßgeblich von der Ladung der endothelialen Glykokalyx beeinflusst wird und eine Ladungsänderung in einer veränderten Barrierefunktion resultiert (van Haaren et al. 2005).

1.4.3.3 Mechanotransduktion durch die endotheliale Glykokalyx

Auf das Gefäßendothel wirken mechanische Kräfte ein, die durch den Blutstrom erzeugt werden. Es ist bekannt, dass diese Scherbeanspruchung sowohl die Morphologie als auch die Funktion der Endothelzellen beeinflusst (Davies 1995; Dewey et al. 1981). Unterliegen die Endothelzellen einer großen Scherbeanspruchung, produzieren sie Stickstoffmonoxid (NO), das zu einer Vasodilatation der Gefäße führt (Rubanyi et al. 1986).

Lange war nicht bekannt, welche Moleküle für die Umwandlung der biomechanischen Kräfte in biochemische Signale (Mechanotransduktion) verantwortlich sind. Die endotheliale Glykokalyx wurde als mögliche Grundlage für diese Mechanotransduktion in Betracht gezogen (Reitsma et al. 2007).

In Experimenten mit kultivierten Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit Heparinase, einem Enzym, das das Glykosaminoglykan Heparansulfat aus der endothelialen Glykokalyx abspaltet, keine gleichwertige Mechanotransduktion und NO-Freisetzung erfolgte (Florian et al. 2003). Ebenfalls wurde nach Zugabe von Hyaluronidase, die das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure schädigt, eine herabgesetzte Antwort auf eine erhöhte Scherbeanspruchung gemessen (Mochizuki et al. 2003). Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass die endotheliale Glykokalyx eine entscheidende Rolle bei der Mechanotransduktion spielt.

1.4.3.4 Zellinteraktion mit Blutbestandteilen

Die endotheliale Glykokalyx beeinflusst die Interaktion zwischen Bestandteilen des Blutes und dem Gefäßendothel. Neben dem Endothel existiert eine Zone im Kapillarlumen, die frei von Erythrozyten ist. Diese zellfreie Zone verschwand, nachdem die endotheliale Glykokalyx zerstört wurde (Vink und Duling 1996). Ähnlich verhält es sich mit den Thrombozyten. Unter physiologischen Bedingungen sind Interaktionen zwischen den Blutplättchen und dem Endothel sehr selten zu beobachten, während nach partieller Zerstörung der endothelialen Glykokalyx ein vermehrtes in Kontakt treten gemessen wurde (Vink et al. 2000).

Die Rolle der endothelialen Glykokalyx im Hinblick auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion besteht darin, die Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen, wie das P-Selektin oder das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül (ICAM1) zu verstecken (Reitsma et al. 2007). Es wurde eine gesteigerte Adhäsion der Leukozyten an das Endothel beobachtet, nachdem das Enzym Heparinase verabreicht wurde (Constantinescu et al. 2003). Der Ansammlung von Leukozyten am Endothel folgt das Selektin-vermittelte „Rolling“ entlang der Gefäßwand. Nach der Integrin-vermittelten Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen ziehen sich diese zusammen und die „Tight junctions“ lösen sich. Dadurch ist eine parazelluläre Passage der Leukozyten möglich.

Unter physiologischen Bedingungen schirmen die Glykosaminoglykanseitenketten die deutlich kleineren Adhäsionsmoleküle des Endothels ab. Wird allerdings die endotheliale Glykokalyx beschädigt, liegen diese Adhäsionsmoleküle frei und die Blutzellen können mit dem Endothel interagieren (Constantinescu et al. 2003; Vink et al. 2000).

1.4.3.5 Blutgerinnung und fibrinolytisches System

Endothelzellen tragen dazu bei, die Blutgerinnung und das fibrinolytische System zu regulieren und übernehmen dadurch eine gefäßprotektive Rolle. Die antikoagulatorische Eigenschaft des Endothels entsteht durch die Bindung von Gerinnungshemmern wie Antithrombin, Heparinkofaktor2 und Thrombomodulin an die endotheliale Glykokalyx (Lijnen und Collen 1997). Das Antikoagulans Antithrombin bindet an Heparansulfat-Glykosaminoglykanseitenketten der endothelialen Glykokalyx (Marcum und Rosenberg 1987; Mertens et al. 1992). Antithrombin, ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein, hemmt die Gerinnungsfaktoren Thrombin, Faktor Xa, IXa, XIa und XIIa. Heparinkofaktor2 fungiert als thrombinspezifischer Proteasehemmer, der durch Dermatan-sulfat in der endothelialen Glykokalyx aktiviert wird (Tovar et al. 2005; Parker und Tollefsen 1985). Thrombomodulin, welches von Endothelzellen gebildet wird, hemmt ebenfalls den Gerinnungsfaktor Thrombin. Um die Bluthämostasie aufrecht zu erhalten, müssen sich das (anti-)koagulatorische und fibrinolytische System im Gleichgewicht befinden. Plasminogen, eine Vorstufe des Plasmins, das Fibrinpolymere in Thromben spaltet, bindet an das Endothel und wird so vor der Inhibition durch α 2-Antiplasmin geschützt (Lijnen und Collen 1997).

All diese antikoagulatorisch und antithrombotisch wirkenden Substanzen, die durch die endotheliale Glykokalyx entweder präsentiert oder aktiviert werden, tragen zu einem gesunden thromboresistenten Endothel bei.

1.4.4 Shedding der endothelialen Glykokalyx

Das Abspalten von einzelnen Bestandteilen der endothelialen Glykokalyx bezeichnet man als „Shedding“. Durch den Abbau kommt es zum Integritätsverlust der endothelialen Glykokalyx und damit einhergehend zu funktionellen Einschränkungen. Daraus resultiert eine Dysfunktion der endothelialen Zellen, die zahlreiche Komplikationen mit sich bringt.

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) (Bruegger et al. 2005), Entzündungsmediatoren wie der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) (Henry und Duling 2000) und hohe Konzentrationen an Lipoproteinen niedriger Dichte (Vink et al. 2000) sind Faktoren, die zu einer Degradierung der endothelialen Struktur führen. Des Weiteren führen Ischämie/Reperfusion (Reitsma et al. 2007), Hypoxie/Reoxygenierung (Johansson et al. 2014), Diabetes (Nieuwdorp et al. 2006) und Sepsis (Nelson et al. 2008) ebenfalls zum Shedding der endothelialen Glykokalyx und den damit verbundenen Konsequenzen.

1.4.5 Substanzen mit protektiver Wirkung auf die endotheliale Glykokalyx

Die Schädigung der endothelialen Glykokalyx mindert die Barrierefunktion der Gefäßwände und führt zu Proteinaustritt in das Gewebe und zur Bildung von Ödemen. Folglich scheint die Sanierung einer bereits geschädigten endothelialen Glykokalyx, aber vor allem der Schutz dieser Schicht, sowohl bei akuten als auch bei chronischen Gefäßerkrankungen ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zu sein (Becker et al. 2010).

In Versuchen mit Mäusen wurde gezeigt, dass die vollständige Wiederherstellung der endothelialen Glykokalyx, nachdem sie mittels Hyaluronidase bzw. TNF- α geschädigt wurde, zwischen fünf und sieben Tagen dauert (Potter et al. 2009). Die genaueren Mechanismen der Wiederherstellung einer geschädigten endothelialen Glykokalyx sind noch weitgehend unbekannt.

Verschiedene Studien ergaben, dass ein Schutz der ESL durch eine ausreichend hohe Konzentration an Plasmaproteinen erreicht werden kann (Jacob et al. 2006). Der Schutz der endothelialen Glykokalyx spielt vor allem bei Organtransplantationen eine entscheidende Rolle. Die vermehrte Anlagerung von Leukozyten, die durch das Reperfusion-induzierte „Shedding“ der Glykokalyx hervorgerufen wird, führt zu akuten und chronischen Schäden und sollte folglich verhindert werden. Das Ziel, das Endothel im Transplantat während der Phase der Ischämie mit Hilfe von Plasmaalbumin zu schützen, beruht auf der Tatsache, dass nur eine mechanisch intakte ESL in der Lage ist, die Reperfusionsphase zu überstehen (Jacob et al. 2009).

Neben Albumin ist auch Hydrocortison, eine synthetische Form des körpereigenen Cortisols, eine Substanz, die protektive Eigenschaften auf die endotheliale Glykokalyx hat. Hydrocortison reduziert die Expression der NO-Synthase und somit die NO-Produktion im Endothel. Es bewirkt einen erhöhten vaskulären Widerstand in der Peripherie und eine verbesserte Ansprechbarkeit der α -adrenergen Rezeptoren. Es wurde gezeigt, dass Hydrocortison die endotheliale Glykokalyx schützt und somit den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion unterstützt. Der genaue Wirkmechanismus ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Versuchsreihen deuten darauf hin, dass eine mögliche Erklärung in der Stabilisation von Mastzellen durch das Cortison liegt. Dadurch wird von den Mastzellen kein Histamin mehr freigesetzt und die Entstehung von endothelialen Lücken bleibt aus (Chappell et al. 2007).

Das antikoagulatorisch wirkende Antithrombin hat ebenfalls einen protektiven Einfluss auf die endotheliale Glykokalyx (Chappell et al. 2009a; Chappell et al. 2009b) und befähigt sie dazu, eine physiologische Permeabilität des Endothels zu gewährleisten.

1.4.6 Bedeutung für die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die hohe Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen ist bisher nur teilweise geklärt (Sarnak et al. 2003). Als mögliche Erklärung für diese Prävalenz wird seit einigen Jahren die endotheliale Glykokalyx in Betracht gezogen (Miranda et al. 2016), die als Marker zur Diagnose von Gefäßschäden verwendet wird (Nieuwdorp et al. 2008). Das Vorliegen einer Mikroalbuminurie wird mit dem Fortschreiten von chronischen Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht. Obwohl die Pathophysiologie der Mikroalbuminurie noch nicht vollständig geklärt ist, legen Daten in der Literatur nahe, dass die endotheliale Glykokalyx involviert ist (Nieuwdorp et al. 2005; Stehouwer und Smulders 2006). In kultivierten glomerulären Endothelzellen wurde bereits gezeigt, dass nach Schädigung der endothelialen Glykokalyx der Durchfluss von Albumin anstieg.

Durch Behandlung der Zellkultur mit Neuraminidase wurde Sialinsäure, ein Bestandteil der glomerulären endothelialen Glykokalyx, geschädigt. Daraus resultierte sowohl eine Veränderung in der Albuminpassage als auch in der Durchlässigkeit für Wasser und kleine gelöste Moleküle.

In weiteren Versuchen wurden Heparansulfat-Glykosaminoglykane spezifisch mit Hilfe von Heparanase1 (HPSE1) geschädigt. Es konnte daraufhin eine erhöhte Albuminpassage beobachtet werden. Der gleiche Effekt konnte nach Zugabe von Heparinase3 beobachtet werden. Im Vergleich zu den Versuchen mit Neuraminidase konnte jedoch keine Veränderung in der Durchlässigkeit für Wasser und kleinere Teilchen beobachtet werden. Indem man HPSE1 in experimentellen Versuchen blockierte, konnten die Heparansulfat-Glykosaminoglykane geschützt werden und es wurde eine verminderte Proteinurie gemessen (Singh et al. 2007).

Da die endotheliale Glykokalyx ein wichtiger Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere ist und entscheidend zur Durchlässigkeit dieser Barriere beiträgt, steht sie immer mehr im Fokus der Nierenforschung. In der vorliegenden Arbeit werden Veränderungen der glomerulären endothelialen Glykokalyx sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

1.5 Grundlagen der Multiphotonenmikroskopie

Bereits im Jahr 1931 wurde die theoretische Grundlage für die simultane Absorption zweier Photonen in einem Atom von der Physikerin Maria Göppert-Mayer etabliert (Göppert-Mayer 1931). Als geeignete Laser entwickelt wurden, folgte die praktische Umsetzung ihrer Theorie und wurde von da an in der medizinischen Forschung genutzt. Dunn und Mitarbeiter verwendeten diese Technik erstmalig an lebenden Tieren und eröffneten damit die

Möglichkeit für die mikroskopische Untersuchung von Geweben und Organen unter physiologischen Bedingungen (Dunn et al. 2002).

Um die Vorteile dieser neuen mikroskopischen Technik gegenüber der konventionellen Einphotonen-Mikroskopie darlegen zu können, erfolgt zunächst eine Einführung in die Prinzipien und physikalischen Grundlagen der Multiphotonenmikroskopie.

1.5.1 Prinzip der Multiphotonenmikroskopie

Das Prinzip der Multiphotonenmikroskopie basiert auf der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe durch zwei oder mehrere Photonen, die gemeinsam die benötigte Anregungsenergie aufbringen (Oheim et al. 2006) und ein Elektron so aus dem Grundzustand in einen höheren Energiezustand (S2-Zustand) versetzen. Zunächst fällt das angeregte Elektron unter Energieverlust zurück in den S1-Zustand. Fällt das angeregte Elektron anschließend wieder auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück, sendet es ein längerwelliges, energieärmeres Photon aus. Der Unterschied der Wellenlängen zwischen dem anregenden kurzwelligen Photon und dem emittierten längerwelligen Photon wird als Stokes'sche-Verschiebung bezeichnet (Anunay 2006).

Fluoreszenz entsteht also, wenn das Fluoreszenzmolekül ankommende Photonen absorbiert und anschließend ein Photon in einer anderen Wellenlänge wieder abgibt. Die Anregungsenergie eines Photons kann durch die von zwei oder mehreren Photonen ersetzt werden, soweit diese in Summe die gleiche Energie liefern. Die Voraussetzung, dass diese Photonen simultan eintreffen müssen, um die benötigte Anregungsenergie bereitzustellen, wird durch eine sehr hohe Photonendichte erreicht, die durch den Einsatz eines pulsierenden Lasers zustande kommt. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Fluophor simultan durch zwei Photonen angeregt wird, ist auf ein Volumen von weniger als einem Femtoliter im Brennpunkt beschränkt (Oheim et al. 2006). Da das emittierte Licht alleinig vom Brennpunkt stammen kann, kann bei der Multiphotonenmikroskopie auf eine Lochblende, die die Emission aus anderen Ebenen abtrennen würde, verzichtet werden. Des Weiteren muss der Strahlengang nicht wie bei der konventionellen konfokalen Mikroskopie zurück gescannt werden. Aus diesem Grund werden nahe an der Probe sogenannte „Non-Descanned“ Detektoren platziert.

1.5.2 Vorteile gegenüber der konventionellen Einphotonenmikroskopie

Aus den physikalischen Unterschieden beider mikroskopischen Methoden ergeben sich zahlreiche Vorteile, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen:

Zwei-Photonen-Anregungsspektren sind verglichen mit Ein-Photonen-Anregungsspektren breiter. Aus diesem Grund kann die Anregung verschiedener Fluophore mit einer einzigen Lichtquelle erfolgen. Da die gesamte entstehende Fluoreszenz aus dem Brennpunkt stammt, ist der Einsatz von sehr sensiblen Detektoren möglich. Die Wellenlänge dieser Lichtquelle ist im Vergleich zur Absorption eines Photons doppelt so groß. Hieraus ergeben sich drei weitere Vorteile: Zum einen ist das anregende Licht energieärmer und somit für das Gewebe weniger phototoxisch. Des Weiteren wird aufgrund der energieärmeren Strahlung das Gewebe weniger ausgebleicht. Ein weiterer Pluspunkt, der vor allem im Hinblick auf die intravitale Mikroskopie entscheidend ist, ist die tiefere Penetration des Gewebes. Die höhere Eindringtiefe wird durch die geringere Frequenz des anregenden Lichts und der daraus resultierenden geringen Streuung im Gewebe gewährleistet (Oheim et al. 2006).

Diese Vorteile ermöglichen es, Strukturen in tieferen Gewebeschichten zu untersuchen und schaffen somit die Voraussetzung für sowohl morphologische als auch funktionelle Untersuchungen in lebendem Gewebe. Des Weiteren bietet das Multiphotonenmikroskop die Möglichkeit, ein Modell der akuten Tubulusnekrose zu imitieren, indem mit hoher fokussierter Laserpower einzelne Zellen geschädigt werden.

Dennoch wird diese Methode bislang nur in wenigen Laboratorien praktiziert. Dies ist zum einen den hohen Anschaffungskosten geschuldet und zum anderen durch die Komplexität dieser Methode und der Vorbereitung der Versuchstiere erklärbar.

2 Fragestellung

Eine Albuminurie kann zum einen durch den Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere und zum anderen durch die reduzierte Fähigkeit des proximalen Tubulus zur Reabsorption entstehen (Toblli et al. 2012). Die akute Tubulusnekrose, deren Symptome eine Albuminurie und eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate sind, ist ein klinisch relevantes Beispiel für eine reduzierte Reabsorptionsfähigkeit im tubulären System (McCullough et al. 2013; Hwang et al. 2017). Die Abnahme der Filtrationsrate während einer akuten Tubulusnekrose legt nahe, dass Schäden im tubulären System Auswirkungen auf die Filtrationsbarriere haben. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit folgende Frage geklärt werden: Führen Schäden im tubulären System zu einer veränderten Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere?

Da die endotheliale Glykokalyx ein wichtiger Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere ist und entscheidend zur Durchlässigkeit dieser Barriere beiträgt, steht sie immer mehr im Fokus der Nierenforschung (Singh et al. 2007). Sie spielt eine große Rolle bei der Umwandlung von biomechanischen Kräften, die auf das Endothel einwirken, in biochemische Signale (Reitsma et al. 2007). Des Weiteren trägt sie zur Erhaltung eines gesunden thromboresistenten Endothels bei. Ihre negative Ladung ist maßgeblich für die ladungsselektive Eigenschaft der glomerulären Filtrationsbarriere verantwortlich (van Haaren et al. 2005; Lijnen und Collen 1997). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Frage geklärt werden, inwieweit Hyaluronidase, ein die endotheliale Glykokalyx schädigendes Enzym, Auswirkungen auf die Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere hat.

Daten in der Literatur legen nahe, dass Angiotensin II (AngII) sowohl den Blutdruck als auch den Siebkoeffizienten für Albumin erhöht (Schießl 2014). In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb folgende Fragen geklärt werden:

Besteht ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere für Albumin und der Struktur der endothelialen Glykokalyx?

Ist der Verlust der Integrität des glomerulären Filters nach AngII-Applikation ein Phänomen, das alleinig durch den AT1-Rezeptor vermittelt wird, oder ein hämodynamisch bedingtes Phänomen, welches auch durch ein anderes vasokonstriktorisches Agens, wie Noradrenalin verursacht wird?

Außerdem sollte die Hypothese geprüft werden, dass die Struktur der endothelialen Glykokalyx mit der Proteinausscheidung im Urin korreliert.

Fragestellung

Die Bearbeitung dieser Fragestellungen erfolgte an Munich Wistar Froemter Ratten mit Hilfe der intravitalen Multiphotonenmikroskopie.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg
Computer	Precision T1700, Dell, Frankfurt a. Main
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, Mini-Protean Tetra Cell, Kalifornien, USA
Elektrophorese-Spannungsgerät	Bio-Rad, Power Pac 3000, Kalifornien, USA
Fluoreszenzlampe	LQ-HXP-120, LEJ Leistungselektronik GmbH, Jena
Isofluran-Verdampfer	Groppler Medizintechnik, Deggendorf
Kamera	AxioCam Mrm, Zeiss, Jena
Kauter	Geiger medical technologies, Iowa, USA
Kühl- und Gefrierschränke	Hera Freeze, Thermo electron corporation, Langensfeld Premium NoFrost, Liebherr, Biberach a.d. Riss
Laser	Chameleon Ultra-II Multiphoton-Lasers, Coherent, USA
Magnetrührer	MR80, Heidolph, Schwabach
Microplate Reader	Tecan Sunrise, Schweiz
Mikroskope	Axio Observer Z1, Zeiss, Jena LSM 710, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM 2165, Leica, Wetzlar
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, Massachusetts, USA
NDD-Filter	ZEISS-Reflektormodul 424931, AHF Analystechnik AG, Tübingen
OP-Tisch Beleuchtung	KL 1500 LCD, Schott, Mainz
Osmometer	Osmomat 030, Gonotec, Berlin
PCR Geräte	Labocycler, SensoQuest, Göttingen Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Wilmington, USA
pH-Meter	Digital pH-Meter, SevenCompact, Mettler, Gießen
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	ISB Integra Biosciences, Chur, Schweiz
PowerLab	PowerLab 8/35, AD Instruments, Spechbach
Ratten-Operationstisch	08301, KE Med. Techn. Gerätebau, Pfaffing a.d. Attel
Schüttler	Rotamax, Heidolph, Schwabach
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Vortexgerät	USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Wägetechnik Dürnberger, Obertraubling

Wärmeplatte	OTS40, Medite Medizintechnik, Burgdorf
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg NeoLab Migge GmbH, Heidelberg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Centrifugal Devices	Pall Lieve Sciences, Ann Arbor, USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Cups	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Tube	Sarstedt, Nümbrecht
Fettstift	Science Services, München
Gewebe-Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Roth, Karlsruhe
Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Insulinspritzen	BD Medical, Le pont de Claix Cedex, Frankreich
Kalium-EDTA Microvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen	Braun, Melsungen
Nähseide	Resorba, Nürnberg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Polyethylen-Tubing (0,97 mm)	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Polyethylen-Tubing (2 mm)	Science Products, Hofheim
Skalpellklingen	Feather Surgical Blade, Japan
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen

3.1.3 Chemikalien und Pharmazeutika

Produkt	Hersteller
Acrylamid + Bis 30%	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Alexa Fluor 594 conjugate	Life Technologies GmbH, Darmstadt
AngII	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dapi	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Dithioerythritol	Fisher scientific, Wien, Österreich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Heparin (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Hyaluronidase	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isofluran	Baxter, Höchststadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
Ketamin 10%	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH,

	Ascheberg
Leukosilk	BSN medical GmbH, Hamburg
Lucifer Yellow	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mecain 10 mg/ml	PUREN Pharma GmbH, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Midazolam 5 mg/ml	ROTEX-Medica, Trittau
Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos
Norepinephrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraffin	Leica, Wetzlar
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
Roti-Load	Roth, Karlsruhe
Wheat germ agglutinin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Xylazin 2%	Serumwerk, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

3.2.1.1 Munich Wistar Froemter Ratten

Für die Untersuchung der Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere mit Hilfe der intravitalem Multiphotonenmikroskopie wurden Munich Wistar Froemter Ratten (MWF) verwendet. Tiere dieses Stammes eignen sich aufgrund ihrer hohen Anzahl an oberflächlich in der Nierenrinde lokalisierten Glomeruli sehr gut für diese Art der Mikroskopie (Hackbarth et al. 1983). Um die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden junge (6-10 Wochen alte) Männchen und Weibchen verwendet. Für die gezielte Untersuchung der Nierenfunktion beim Vorliegen einer Proteinurie wurden ältere männliche MWF Ratten gewählt (>4 Monate), da diese nachweislich mit zunehmendem Alter einen Hypertonus und eine Proteinurie entwickeln (Hackbarth et al. 1991).

3.2.1.2 Mäuse

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Mauslinie generiert. Hierzu wurden Pax8-Mäuse (Bouchard et al. 2004) mit GCamp5 Mäusen (Gee et al. 2014) verpaart. Die Feststellung des Genotyps erfolgte durch eine PCR-Analyse genomischer DNA. Hierfür wurden die Mäuse einer Schwanzspitzenbiopsie unterzogen und das gewonnene Material einer Restriktionsanalyse zugeführt. Das Pax8xGCamp5 Mausmodell wurde entwickelt, um eine calciumbasierte Zellkommunikation in vivo untersuchen zu können. Die Mäuse

exprimieren sowohl Tomato als auch das fluoreszierende Calcium Indikatorprotein GCamp5 in Tubuluszellen.

Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Unterfranken unter den Aktenzeichen 55.2-2532.1-32/14 (04.03.2015) und 55.2-2532-2-476 (12.06.2017) genehmigt.

3.2.2 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden bei Raumtemperatur (23 ± 2 °C, Luftfeuchte: $55\pm 5\%$) in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Den Versuchstieren stand Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

3.2.3 Vorbereitung der Versuchstiere und Voraussetzungen für die mikroskopische Untersuchung

Für die Durchführung der Versuche mussten die Tiere zunächst einem chirurgischen Eingriff unterzogen werden, um die Voraussetzung für die intravitale Multiphotonenmikroskopie zu erfüllen.

Die Versuchsratten wurden zunächst durch eine kombinierte Narkose (100 mg/kg Ketamin, 3,45 mg/kg Xylazin und 2 mg/kg Midazolam) intramuskulär anästhesiert. Die Anästhesie wurde während des Experiments mittels Isofluran-Narkose (1-2 Vol%) aufrechterhalten und die Narkosetiefe alle 10 Minuten durch das Testen des Zwischenzehenreflexes überprüft. Um die Cornea vor dem Austrocknen zu schützen, wurde zu Beginn der Narkose eine befeuchtende Augensalbe aufgetragen. Das narkotisierte Tier wurde in Rückenlage auf einem beheizbaren Operationstisch fixiert. Eine zusätzliche Rotlichtlampe verhinderte das Absinken der Körpertemperatur (physiologisch: $36,5\text{--}37,9$ °C), die mit Hilfe einer Rektalsonde gemessen wurde. Nach subkutaner Injektion des Lokalanästhetikums Mecain wurde die Haut und Unterhaut ventral auf Höhe der Mandibularäste aufgeschnitten und anschließend der Schnitt bis auf Höhe des Brusteingangs verlängert. Nachdem die linke Arteria carotis frei präpariert wurde, erfolgte die Katheterisierung mit einem handgezogenen heparinisierten Polyethylen-Tubus. Dieser Katheter dient der Messung des Blutdrucks und der Herzfrequenz. Beide Parameter mussten während des Versuchs kontrolliert werden, um nachzuweisen, dass die Nierenperfusion über die gesamte Versuchsdauer physiologisch war. Die für die Versuche notwendigen Substanzen wie Farbstoffe, Hyaluronidase, AngII oder Noradrenalin wurden über einen Katheter in der rechten Vena jugularis injiziert. Eine in steriler Kochsalzlösung getränkte Watte verhinderte die Austrocknung der Operationswunde. Anschließend wurde die Ratte auf

die rechte Körperseite gedreht, die Lage der linken Niere ertastet und das Areal um die linke Niere gründlich geschoren, gereinigt und desinfiziert. Nach einem kleinen Schnitt konnte die Niere vorsichtig durch sanften Druck ventral des Organs aus der Abdominalhöhle hervorgelagert werden. Um Atemartefakte während der mikroskopischen Aufnahmen zu vermeiden, wurde die Niere auf ein Deckglas geklebt, das wiederum auf einem etwa 1 cm hohen Kunststoffring befestigt war. Durch einen beheizbaren Einsatz, der in den Mikroskopisch eingelassen ist, konnte die physiologische Körpertemperatur der Versuchstiere während des Experiments aufrechterhalten werden. Zusätzlich wurde die Ratte mit einer wärmeisolierenden Folie zugedeckt.

Die Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte bei einer Wellenlänge von 860 nm durch einen Chameleon Ultra-II Multiphotonen-Laser (Coherent). Das 40er Wasserobjektiv diente zur Vergrößerung der Strukturen. Externe Detektoren detektierten die emittierten Fluophore. Die externen Detektoren waren mit folgenden Bandpassfiltern ausgestattet:

- Grüner Kanal: 500-550 nm
- Roter Kanal: 565-610 nm

3.2.4 Bestimmung funktioneller Parameter der Nierenfunktion mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie

Das auf dem Mikroskopisch platzierte Versuchstier wurde zugedeckt und es erfolgte die Verknüpfung des arteriellen Tubus mit dem Druckmessfühler, der das Signal mittels des Programmes „PowerLab“ aufzeichnete. Die Durchführung verschiedener Messmethoden zur Untersuchung der Nierenfunktion wird im Folgenden beschrieben.

3.2.4.1 Glomerulärer Siebkoeffizient für Albumin

Der glomeruläre Siebkoeffizient für Albumin (GSC_A) stellt ein Maß für die Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere dar. Er ist definiert als das Verhältnis der Albuminkonzentration im Filtrat zur Albuminkonzentration im Plasma (Deen 2004). Um die Albuminkonzentration messen zu können, wurde ein an Albumin gekoppelter Farbstoff (Alexa Fluor 594; 5 $\mu\text{g/g}$ KGW) in die Vene injiziert. Die Intensität des Farbstoffes korreliert positiv mit der Albuminkonzentration. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie im roten Kanal detektiert. Ausreichende Farbintensität unter Vermeidung der Überbelichtung konnte durch die Anregung des Farbstoffes mit einer Laserpower von 6% erreicht werden. Die Pixelanzahl betrug 512x512.

Es wurden vier oberflächlich lokalisierte Glomeruli pro Versuchstier unter der HXP-Lampe identifiziert. Mit Hilfe der Second Harmonic Generation konnte eine Messtiefe von 30 μm unter der Nierenkapsel eingestellt werden. Dies gewährleistete eine konstante Fluoreszenzintensität zwischen den Messungen. Bei dieser Technik wird die Energie zweier Photonen als Anregungsenergie genutzt. Ein anderes Photon wird dann mit der doppelten Energie reflektiert. Dieses Ereignis tritt nur dann auf, wenn die zwei Photonen auf eine nicht-zentrosymmetrische Struktur, wie die kollagenfaserreiche Nierenkapsel treffen (Brown et al. 2013; Oheim et al. 2006). Um die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes zu bestimmen, wurden zunächst basale Aufnahmen vor Farbstoffinjektion angefertigt. Die Berechnung des Siebkoeffizienten erfolgte durch eine Zeitserie von sechs Bildern im Abstand von 10 Sekunden mit 512x512 Pixeln. So konnte ein Mittelwert aus sechs Messbildern ermittelt und das Risiko für eine laserinduzierte Schädigung des Gewebes gering gehalten werden. Nach Injektion des Farbstoffes über den venösen Katheter wurde unter Nutzung der Second Harmonic Generation die gleiche Ebene wie in den basalen Messungen eingestellt und eine Zeitserie erstellt. Um zu vermeiden, dass das Durchscheinen von Kapillaren, die in einer anderen als der gemessenen Ebene liegen, die Intensität im Harnraum verfälscht, wurde zusätzlich ein Z-Stapel angefertigt. Zunächst wurden die Fluoreszenzintensitäten der basalen Aufnahmen sowohl im Harnraum als auch im Bereich des glomerulären Kapillarknäuels gemessen. Die Fluoreszenzintensität in den glomerulären Kapillaren wurde in drei Messregionen ermittelt. Hier war darauf zu achten, dass die Regionen so platziert wurden, dass die Intensität nicht durch ungefärbte Erythrozyten vermindert wurde. Die Platzierung der Messregionen am Rand der Kapillaren erwies sich deshalb als sinnvoll. Die Intensitätsmessung im Harnraum erfolgte an zwei Messregionen. Hier war es besonders wichtig die Messregion so zu platzieren, dass die Ergebnisse nicht durch aus anderen Ebenen durchscheinende Kapillaren verfälscht wurden. Für die Ermittlung einer exakten Platzierung der Messregion wurde der Z-Stapel verwendet.

Der Siebkoeffizient für Albumin wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$\text{GSC} = \frac{(\text{Intensität Harnraum} - \text{Intensität Hintergrund})}{(\text{Intensität Kapillaren} - \text{Intensität Hintergrund})}$$

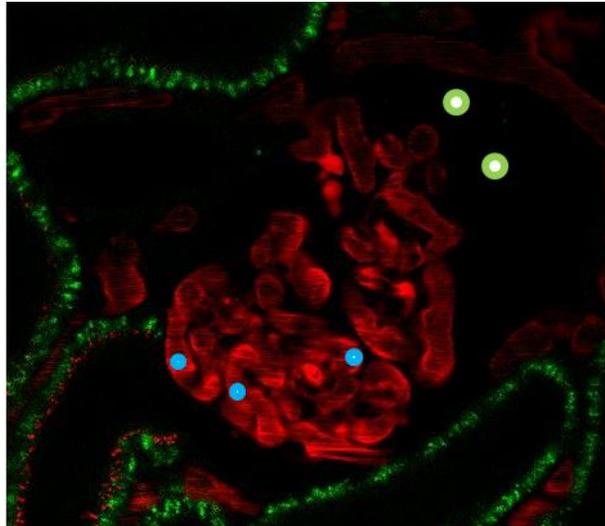


Abbildung 3: Darstellung der Messregionen für den Siebkoeffizienten für Albumin: Die mittlere Fluoreszenzintensität des an Albumin gekoppelten Farbstoffs Alexa Fluor 594 wurde sowohl im Harnraum (grüne Kreise) als auch in den glomerulären Kapillaren (blaue Kreise) ermittelt.

3.2.4.2 Glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons

Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate des Einzelneurons (snGFR) erfolgte mit Hilfe des frei filtrierbaren Farbstoffs Lucifer yellow (LY). Für die Berechnung der glomerulären Filtrationsrate wurde zunächst ein Glomerulus mit einem gut sichtbaren proximalen Tubulus unter der HXP-Lampe eingestellt und ein Line Scan angefertigt. Das Messareal wurde senkrecht zur Flussrichtung in den proximalen Tubulus gelegt. Die Aufnahme einer schnellen Zeiterie erfolgte im bidirektionalen Scan, wobei die hohe Scangeschwindigkeit durch ein Herabsetzen der Bildqualität (125x125 Pixel) erreicht wurde. Nach Start der Aufnahme folgte die Injektion eines Bolus von 20 µl LY (5 mg/ml). Das An- und Abfluten des Farbstoffs im proximalen Tubulus konnte mit Hilfe des Line Scans dargestellt werden. Eine Steigungsgerade wurde in den abfallenden Teil der Kurve, die den Intensitätsverlauf darstellte, gelegt. Der Mittelwert aller basal gemessenen Steigungen wurde mit dem physiologischen Wert von 22 nl/min gleichgesetzt. Die nach der akuten Schädigung von proximalen Tubuluszellen auf gleiche Weise gewonnenen Werte wurden mit den so generierten Basalwerten verglichen. So konnten die

Steigungen der Geraden, die ein Maß für das An- und Abfluten darstellen, objektiv verglichen werden.

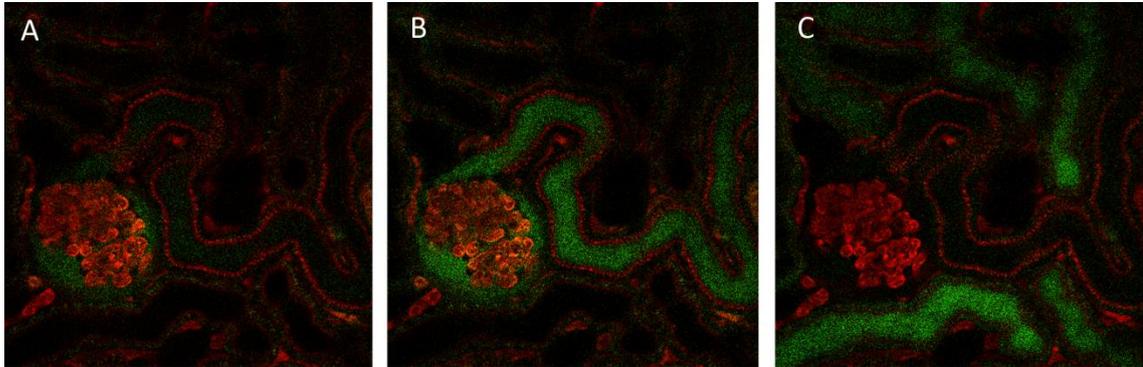


Abbildung 4: Filtration von LY zur Messung der $snGFR$:

LY wird in die Bowman Kapsel filtriert (A), strömt den proximalen Tubulus entlang (B) und erscheint im distalen Tubulus (C).

3.2.5 Visualisierung der endothelialen Glykokalyx mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie

Für die Färbung der glomerulären endothelialen Glykokalyx wurde der Farbstoff wheat germ agglutinin ($3 \mu\text{g/g KGW}$) mittels i. v. Injektion appliziert (Barker et al. 2004b). Die Untersuchung der endothelialen Glykokalyx im lebenden Tier hatte im Vergleich zu immunhistochemisch gefärbten Nierenschnitten den Vorteil, Veränderungen unter physiologischen Bedingungen darstellen zu können. Die Anregung des Farbstoffs erfolgte mit einer Laserpower von 24% und die Farbintensität wurde im grünen Kanal detektiert. Der Digital Gain betrug 10, während das Digital Offset auf 0 eingestellt war. Die Pixelanzahl betrug 1024×1024 . Die Datenverarbeitung und Auswertung erfolgte mittels der Zeiss Zen 2010 B SP1 Software.

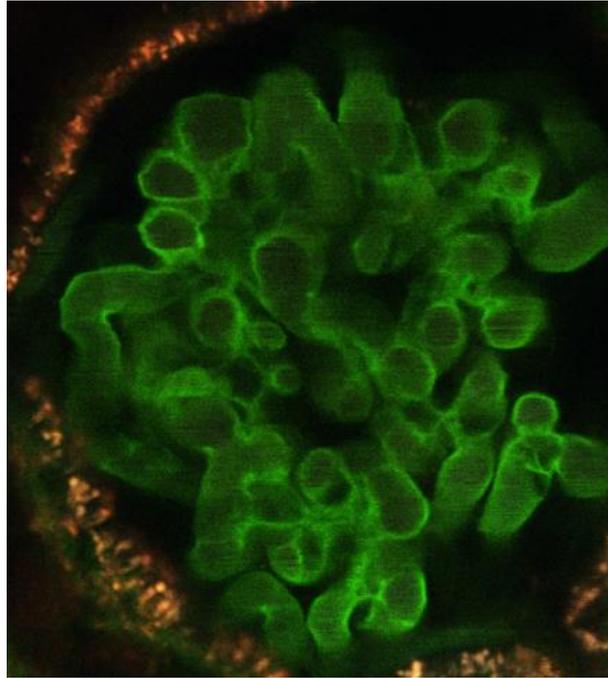


Abbildung 5: Darstellung der endothelialen Glykokalyx mittels wheat germ agglutinin mit Hilfe der intravitalen Multiphotonenmikroskopie

3.2.6 Histologische Methoden

3.2.6.1 Retrograde arterielle Perfusionsfixierung der Nieren

Um die Nieren für histologische Untersuchungen zugänglich zu machen, wurden sie vor ihrer Entnahme mit Paraformaldehydlösung (3%, gelöst in PBS, pH: 7,35) fixiert. Dieses Fixiermittel dient zur Erhaltung der ursprünglichen Organform und verhindert autokatalytische Vorgänge. Außerdem führt diese Methode dazu, dass das Nierengewebe aushärtet, was die spätere Anfertigung von dünnen Gewebeschnitten ermöglicht. Die Versuchstiere wurden mittels Narcoren-Injektion (400 mg/kg KGW) euthanasiert und anschließend in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Nachdem die Bauchhöhle eröffnet wurde, folgte das Freipräparieren der Bauchorta. Diese wurde kranial des Abgangs der Arteria renalis abgeklemmt. Nach einem Schnitt in der Aorta wurde mit Hilfe eines Gefäßdilators der Perfusionskatheter eingeführt. Die Fixierung des Katheters erfolgte mit einem geflochtenen Polyethylenfaden. Anschließend folgte das Lösen der Klemme. Ein Schnitt in der Vena cava diente dazu, dass das Blut abfließen und anschließend abgesaugt werden konnte. Bei einem konstanten Perfusionsdruck von 70 mmHg erfolgte die retrograde Perfusion. Auf die Infusion mit Kochsalzlösung folgte die Fixierung der Organe mit der Paraformaldehydlösung. Die Nieren wurden anschließend entnommen und nach Entfernung der Kapsel in 70%igen Methanol bei 8 °C aufbewahrt.

3.2.6.2 Einbetten in Paraffin und Anfertigung von Nierenschnitten

In Gewebe-Einbettkassetten durchliefen die Nieren eine aufsteigende Alkoholreihe, die das Gewebe dehydrierte. Anschließend wurden die Nieren zweimal für 24 h in flüssigem Paraffin bei 60 °C inkubiert. Nachdem die Nieren in mit Paraffin gefüllte Einbettformen gelegt wurden, erfolgte die Abkühlung und Aushärtung des Paraffins in einem kalten Wasserbad. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 5 µm dicke Schnitte erstellt, die in einem 40 °C warmen Wasserbad auf einen Objektträger gezogen wurden. In einem Wärmeschrank trockneten diese für mindestens sechs Stunden.

3.2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung

Vor der Färbung der histologischen Schnitte erfolgte ein Entparaffinieren in Xylol und Isopropanol. Die Immunhistochemie ist eine Methode, bei der das zu untersuchende Gewebe mit an Antikörpern gekoppelten Farbstoffen angefärbt wird. Der zunächst hinzugegebene Antikörper bindet spezifisch an das zu untersuchende Protein. Als Nächstes wird ein sekundärer Antikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, hinzugegeben. Dieser sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper. Der Farbstoff wird durch die Anregung mit einer geeigneten Wellenlänge unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Die Färbung der endothelialen Glykokalyx auf den entparaffinierten Nierenschnitten erfolgte mit folgendem Protokoll:

- 2x5 min in destilliertem Wasser waschen
- 3x5 min in PBS waschen
- Inkubation mit wheat germ agglutinin (25 µg/ml) für 1 Stunde in der Feuchtkammer
- 15 min waschen in PBS
- Eindeckeln mit Mounting Medium
- für mindestens 2 Stunden im Kühlschrank aushärten lassen
- lichtgeschützte Lagerung

3.2.6.4 Untersuchung der Nierenschnitte am Multiphotonenmikroskop

Die Untersuchung und Visualisierung der mittels wheat germ agglutinin angefärbten endothelialen Glykokalyx erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des LSM710-Mikroskops. Die Farbintensität wurde im grünen Kanal detektiert. Die Einstellungen am Mikroskop wurden folgendermaßen gewählt: Laserpower: 10%; Master Gain: 654; Digital Gain: 1,24; Digital Offset: 0; Pixelanzahl: 512x512; Averaging: 4. Die Datenverarbeitung und Auswertung erfolgte mittels der Zeiss Zen 2010 B SP1 Software.

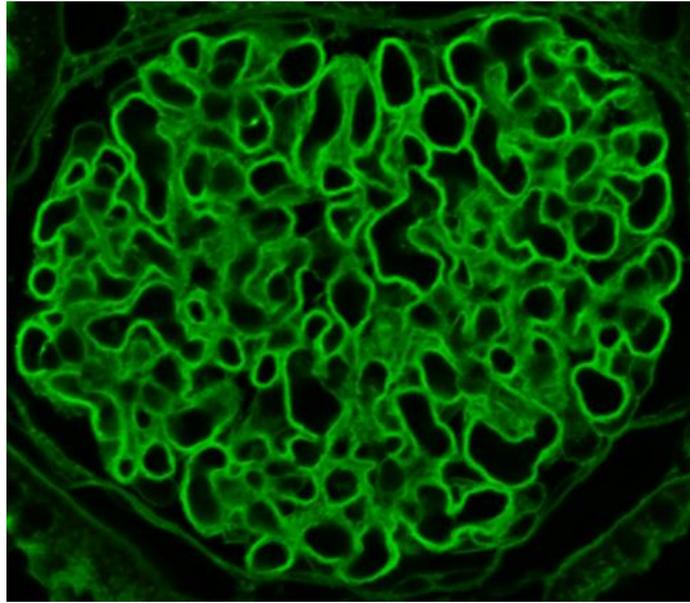


Abbildung 6: Darstellung der endothelialen Glykokalyx mittels wheat germ agglutinin mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie

3.2.7 Nachweis von Syndekan1, Heparansulfat und Hyaluronsäure

3.2.7.1 Urin- und Plasmagewinnung

Um die Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die einzelnen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx genauer zu untersuchen, wurden zunächst basale Urin- und Plasmaproben gesammelt. Die Probensammlung erfolgte bis auf die basalen Urinproben in Narkose.

Für die basalen Urinproben wurde Spontanurin aufgesammelt. Nach Abschluss des jeweiligen Experimentes erfolgte die Uringewinnung durch Blasenpunktion. Die Urinosmolarität wurde durch Gefrierpunktniedrigung ermittelt. Zur Gewinnung der basalen Blutproben wurde ein etwa 1 mm großes Stück vom distalen Schwanzende abgetrennt und die Stelle anschließend verödet. Vor Euthanasie der Versuchstiere mittels intravenöser Narcoren-Injektion, wurde die abschließend zu untersuchende Blutprobe mittels Herzpunktion gewonnen.

3.2.7.2 ELISA

Es wurden drei verschiedene Bestandteile der endothelialen Glykokalyx untersucht: Syndekan1, Heparansulfat und Hyaluronidase.

Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mit Hilfe von ELISAS, antikörperbasierten Nachweisverfahren. Für die Bestimmung von Syndekan1 und Heparansulfat wurde ein

Sandwich ELISA benutzt, bei dem zwei Antikörper verwendet werden. Beide Antikörper binden spezifisch an das nachzuweisende Antigen, jedoch an verschiedenen Epitopen. Der erste Antikörper ist an die Mikrotiterplatte gebunden. Nach Hinzugeben der Probe bindet das zu untersuchende Antigen an dem gebundenen Antikörper. Anschließend erfolgt ein Waschvorgang, der die ungebundenen Anteile der Probe wieder entfernt. Es folgt das Zugabe eines zweiten primären Antikörpers, eines sogenannten Detektionsantikörpers. Nach Hinzupipettieren des markierten Sekundäntikörpers, der an den zweiten Primäntikörper bindet, wird eine Farbreaktion katalysiert, deren Intensität als quantitativer Nachweis dient.

Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure wurde mittels eines kompetitiven Immunassays quantifiziert. Hierbei bindet ein Antigenkonjugat den primären Antikörper überall dort, wo er nicht an das zu untersuchende Antigen aus der Probe gebunden hat. Je mehr Antigen also in der Probe vorhanden ist, desto weniger konjugiertes Antigen kann gebunden werden. Bei einem kompetitiven ELISA ist das Verhältnis zwischen der Konzentration des zu untersuchenden Antigens und der gemessenen Signalstärke umgekehrt proportional.

3.2.8 Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin

Die Bestimmung des Gesamtproteins im Urin erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays. Der Urin wurde über Nacht in Aceton mit 10%iger Trichloressigsäure und 0,21%igen Dithioerythritol präzipitiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in Aceton gewaschen. Die Konzentration des gelösten Proteins wurde durch einen Bio-Rad Protein Assay Kit mit anschließender Konzentrationsmessung im Microplate Reader Tecan Sunrise bei 595 nm bestimmt. Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurden die Proteinkonzentrationen auf die Osmolarität der jeweiligen Urinproben bezogen.

3.2.9 Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Page (engl. Abkürzung für sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Die gesammelten Urinproben wurden hierfür im Verhältnis 1:7,5 in 0,9%igen NaCl verdünnt. Das dem Probenmaterial hinzugegebene Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an die Proteine und verleiht diesen proportional zur molekularen Masse des Proteins eine negative Ladung. Das Reduktionsmittel Dithioerythritol dient zur Auflösung der Disulfidbrücken und denaturiert die Proteine vollständig. Anschließend wird der Probe Glycerol hinzugefügt. Die Proben werden

auf ein 10%iges Polyacrylamidgel (Verhältnis Acrylamid zu Bis: 37,5:1) aufgetragen. Die elektrische Spannung (100 Volt) wurde für eine Stunde angelegt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgt das Sichtbarmachen der Proteinbanden mittels des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau. Durch das Auftragen von Proteinen bekannter Größe kann die Molekülmasse der Proteine im Probenmaterial geschätzt werden.

3.2.10 Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin

Für die Analyse der basalen Urinproben wurde Spontanurin aufgesammelt. Nach Abschluss des jeweiligen Experimentes erfolgte die Uringewinnung durch Blasenpunktion. Die Urinosmolaritätsbestimmung erfolgte durch Gefrierpunkterniedrigung. Für die Bestimmung der Albuminkonzentration wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Die gewonnenen Daten wurden anschließend auf die Osmolarität der jeweiligen Urinproben bezogen, um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können.

3.2.11 Zellkultur

Für die Experimente wurden humane renale glomeruläre endotheliale Primärzellen (HRGEC) verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem endothelialen Kulturmedium (ECM-Medium), das mit 4,7%igen fetalen bovines Serum (FBS), einer 0,9%igen Lösung mit endothelialen Wachstumsfaktoren (ECGS), 100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt war, bei 37 °C unter 5%iger CO₂-Begasung. Die endotheliale Glykokalyx der glomerulären Endothelzellen wurde mittels wheat germ agglutinin (10 µg/ml), das mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde, gefärbt. Die Konzentrationen der hinzugegebenen Substanzen waren wie folgt:

ATP: 0,1 mmol/l, ADO: 1 µmol/l, SNP: 0,1 mmol/l

Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Dapi (12,5 µg/ml), der mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt wurde.

Die kultivierten Endothelzellen wurden unter Verwendung eines Axio Observer LSM710 Lasers und der Zeiss Zen 2010 B SP1 Software untersucht und digitalisiert. Die angefertigten Z-Stapel wurden anschließend mittels „Stitch Mode“ und „Maximum Intensity Projection“ übereinander gelagert und die relative Intensität, die ein Maß für die Dichte der endothelialen Glykokalyx darstellt, vermessen. Für die Aufnahmen der endothelialen Glykokalyx wurden am LSM folgende Einstellungen verwendet: Laserpower: 3%, Master Gain: 650, Digital Gain: 1, Digital Offset: 0, Pixel dwell: 50,64 µs, Pinhole: 1,14 AU

3.2.12 Statistische Auswertung

Für die Analyse der Daten wurde Microsoft Excel 2010 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism 5. Der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts wurden aus den Einzelwerten ermittelt. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde ein einseitiger ANOVA Test angewendet. Um die Signifikanz für Einzelvergleiche zu ermitteln wurde der Student's t-Test durchgeführt. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft und die Ergebnisse mit der entsprechenden Anzahl an Sternen (*) markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

4.1.1 Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Siebkoeffizienten für Albumin

Um die Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin zu ermitteln, wurde zunächst der basale Siebkoeffizient für Albumin bestimmt. Es wurde ein mittlerer basaler Siebkoeffizient für Albumin von $0,01 \pm 0,002$ ($n=26$) gemessen. Die akute Tubulusnekrose wurde durch Schädigung einzelner Tubulusepithelzellen mittels fokussierter Laserexposition simuliert. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen einer lokalen Schädigung in einer ansonsten gesunden Niere zu untersuchen, statt auf ein globales Schädigungsmodell zurückgreifen zu müssen. Der Siebkoeffizient für Albumin wurde 20 Minuten nach Ablation einzelner Epithelzellen des proximalen Tubulus erneut gemessen.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, stieg der Siebkoeffizient für Albumin 20 Minuten nach Schädigung des proximalen Tubulus auf einen mittleren Wert von $0,024 \pm 0,003$ ($n=26$, $p=0,003$) an. Um anästhesiebedingte Veränderungen des Siebkoeffizienten für Albumin und mögliche zeitabhängige Veränderungen der Farbstoffintensität und der damit korrelierenden Albuminkonzentration auszuschließen, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Der Siebkoeffizient der Negativkontrolle blieb hierbei unverändert.

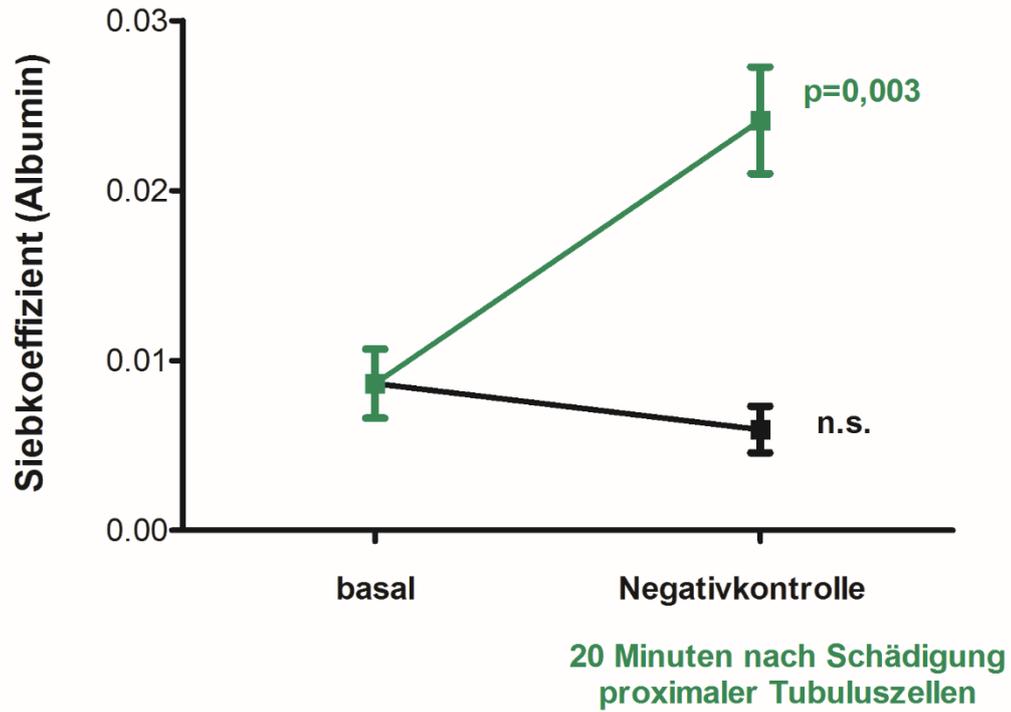


Abbildung 7: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin: Der Siebkoeffizient für Albumin stieg 20 Minuten nach Schädigung proximaler Tubuluszellen an. In den Negativkontrollen blieb der Siebkoeffizient für Albumin unverändert.

Um auszuschließen, dass der gesetzte Laserschaden wärmebedingte Veränderungen des Siebkoeffizienten für Albumin auslöst, wurde der Siebkoeffizient in einem räumlich nahe am Schaden gelegenen, aber zu einem anderen Nephron gehörenden Glomerulus gemessen (Abbildung 8).

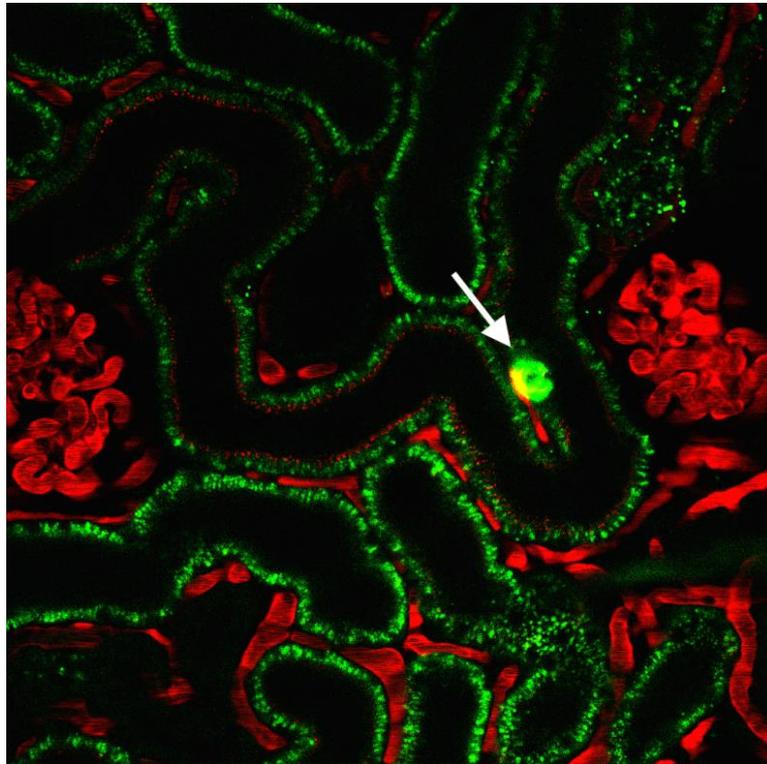


Abbildung 8: Nephronspezifischer Anstieg des Siebkoeffizienten für Albumin: Der Siebkoeffizient des linken Glomerulus, dessen proximaler Tubulus mittels fokussierter Laserexposition geschädigt wurde (weißer Pfeil), stieg an. Der Siebkoeffizient des rechten Glomerulus blieb unverändert, obwohl es näher am laserinduzierten Schaden lokalisiert war.

4.1.2 Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Filtrationsrate des Einzelneurons

Klinisch relevante Folgen der akuten Tubulusnekrose sind zum einen die Albuminurie und zum anderen eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate. Da im vorhergehenden Experiment gezeigt wurde, dass akute Schädigungen im proximalen Tubulus eine erhöhte Albuminfiltration zur Folge haben, sollte nun überprüft werden, ob auch die glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons (snGFR) beeinflusst wird. Die basale snGFR betrug im Mittel $21,03 \pm 1,8$ nl/min ($n=18$). Sowohl zwei als auch 20 Minuten nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen wurde die snGFR erneut gemessen. Nach zwei Minuten betrug die snGFR im Mittel $18,26 \pm 2,1$ nl/min

(n=18) und nach 20 Minuten $18,25 \pm 1,7$ nl/min (n=18). Die Änderungen der snGFR nach Schädigung des proximalen Tubulus waren, wie in Abbildung 9 dargestellt, nicht signifikant. Die Kontrollexperimente ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der snGFR.

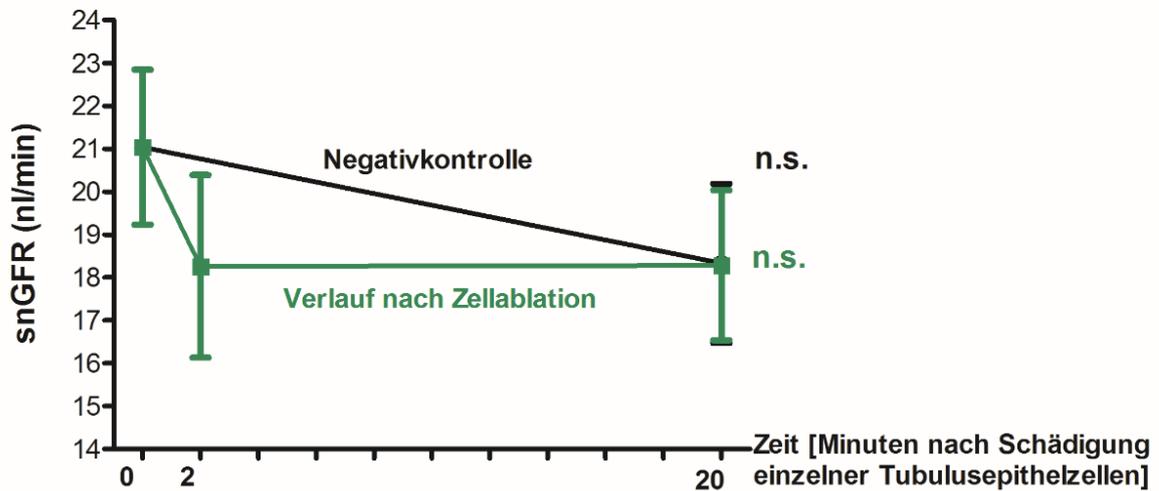


Abbildung 9: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die snGFR: Die snGFR blieb nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen unverändert. Die Kontrollexperimente ergaben keine Veränderung der snGFR.

4.1.3 Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Durchmesser des proximalen Tubulus

Eine laserinduzierte Schädigung von proximalen Tubuluszellen und ein damit verbundenes Abschilfern des Zellmaterials könnte eine Verlegung des Tubuluslumens hervorrufen. Das Filtrat könnte nicht mehr vollständig abfließen, würde sich vor der Engstelle des distalen Tubulus anstauen und das Lumen des proximalen Tubulus dehnen. Um die Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Durchmesser des proximalen Tubulus zu bestimmen, wurde zunächst der mittlere basale Querschnitt ermittelt. Dieser betrug basal $25,83 \pm 0,4$ μm (n=7), zwei Minuten nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen $26,91 \pm 0,3$ μm (n=7) und 20 Minuten nach Schädigung proximaler Tubuluszellen stieg er auf $28,85 \pm 0,4$ μm (n=7) an (Abbildung 10).

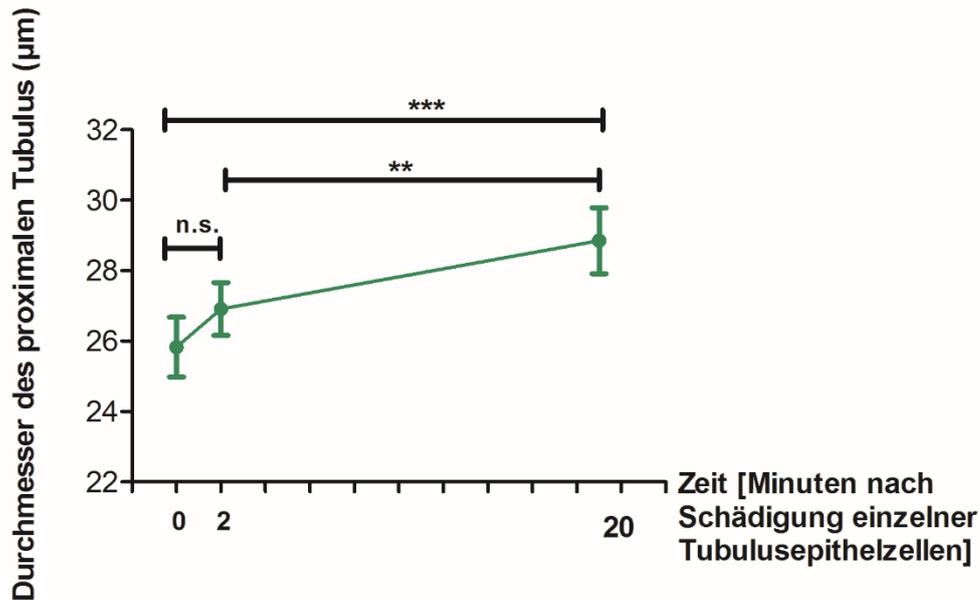


Abbildung 10: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Querschnitt des proximalen Tubulus: Zwei Minuten nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen war keine Veränderung messbar, während der Durchmesser des proximalen Tubulus 20 Minuten nach der Schädigung einzelner Tubulusepithelzellen zunahm (** zeigt $p \leq 0,01$, *** zeigt $p \leq 0,001$).

4.1.4 Auswirkung einer akuten Tubulusnekrose auf die endotheliale Glykokalyx

In vorigen Experimenten wurde gezeigt, dass akute Schäden im proximalen Tubulus zu einem erhöhten Siebkoeffizienten für Albumin führen. Da einem erhöhten Siebkoeffizienten unter anderem ein Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zugrunde liegt, wurde als Nächstes die erste Komponente des glomerulären Filters, die endotheliale Glykokalyx untersucht. Die endotheliale Glykokalyx wurde mittels wheat germ agglutinin gefärbt und anschließend die Intensität des Farbstoffes, die mit der Dichte der endothelialen Glykokalyx korreliert, gemessen. Die mittlere Dichte der endothelialen Glykokalyx betrug basal $14,54 \pm 1,03$ rU ($n=24$). 20 Minuten nach Schädigung einzelner Tubulusepithelzellen sank die Dichte der endothelialen Glykokalyx auf $11,36 \pm 0,8$ rU ($n=15$, $p=0,004$), während sie in der Kontrollgruppe ($n=19$) unverändert blieb (Abbildung 11).

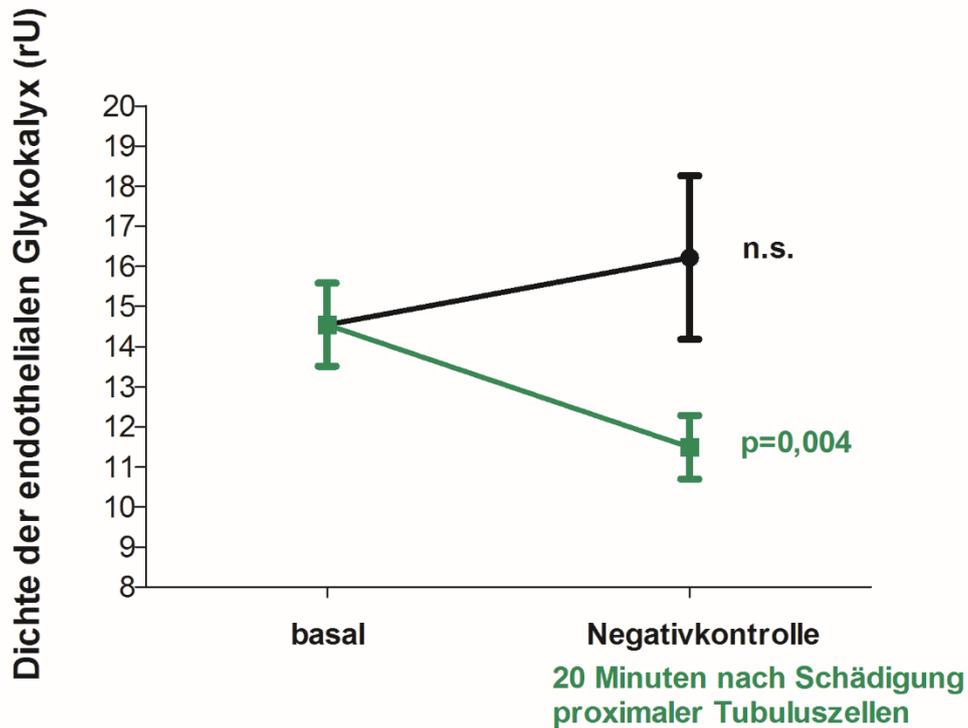


Abbildung 11: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx sank 20 Minuten nach Schädigung proximaler Tubulusepithelzellen, während sie in den Kontrollexperimenten unverändert blieb.

Zusammenfassend konnten die Experimente zeigen, dass eine akute Schädigung proximaler Tubulusepithelzellen zu einem nephronspezifischen Anstieg des Siebkoeffizienten für Albumin führte. Die glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons änderte sich nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen nicht, wohingegen der Durchmesser des proximalen Tubulus anstieg. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx sank 20 Minuten nach Schädigung einzelner proximaler Tubulusepithelzellen.

4.2 Calciumbasierte Zell-Zell-Kommunikation im tubulären System

Die bisherigen Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine Kommunikation zwischen dem tubulären System und dem Glomerulus vorliegt. Für den folgenden Versuch wurde das Mausmodell Pax8xGCamp5 verwendet, um zunächst eine calciumbasierte Zellkommunikation zu untersuchen. Die Mäuse exprimieren sowohl Tomato als auch das fluoreszierende Calcium Indikatorprotein GCamp5 in Tubuluszellen.

Nachdem einzelne tubuläre Zellen fokussierter Laserstrahlung ausgesetzt wurden, konnte in einigen benachbarten Tubuluszellen ein Farbumschlag von Rot nach Grün beobachtet werden (Abbildung 12). Diese Grünfärbung zeigt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration an. Es liegt nahe, dass akute Zellschäden eine calciumbasierte Zellkommunikation zwischen einzelnen Tubuluszellen hervorrufen, welche die Grundlage für die Kommunikation zwischen dem Tubulussystem und dem Glomerulus darstellen könnte.



Abbildung 12: Zell-Zell-Kommunikation: Die laserinduzierte Schädigung einzelner Tubuluszellen (grüner Pfeil) erzeugte eine Calciumwelle in den benachbarten Tubuluszellen (weiße Pfeile).

4.3 Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

4.3.1 Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf den Siebkoeffizienten für Albumin

Um die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die glomeruläre Filtrationsbarriere zu klären, wurde diese durch Gabe von Hyaluronidase geschädigt. Dabei sollte überprüft werden, ob durch das „Shedding“ der endothelialen Glykokalyx die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beeinträchtigt wird. Hierfür wurde zunächst der mittlere basale Siebkoeffizient für Albumin bestimmt. Dieser betrug basal $0,024 \pm 0,004$ ($n=8$) während er 20 Minuten nach Verabreichung der Hyaluronidase auf $0,038 \pm 0,004$ ($n=8$, $p=0,004$) anstieg (Abbildung 13). Um anästhesiebedingte Veränderungen des Siebkoeffizienten für Albumin und mögliche zeitabhängige Veränderungen der Farbstoffintensität und der damit korrelierenden Albuminkonzentration auszuschließen, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Der Siebkoeffizient der Negativkontrolle blieb hierbei unverändert.

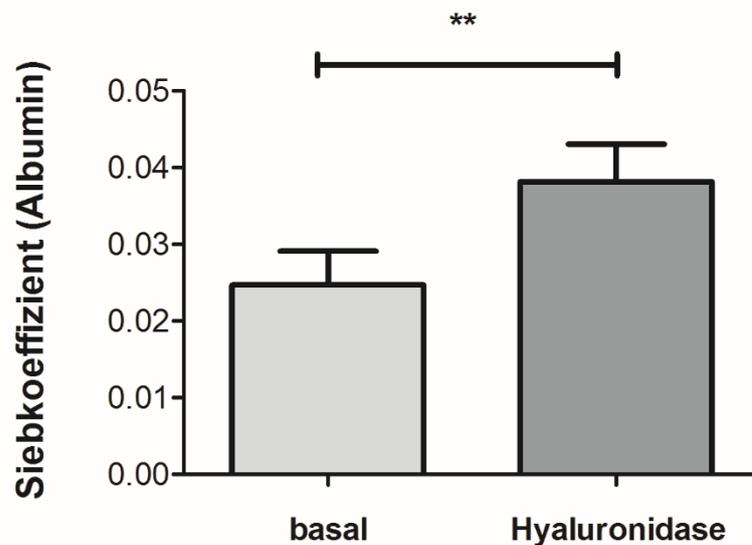


Abbildung 13: Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin: Der Siebkoeffizient für Albumin stieg 20 Minuten nach Hyaluronidase-Injektion an (** zeigt $p=0,004$).

4.3.2 Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Proteinausscheidung im Urin

Nach Schädigung der endothelialen Glykokalyx stieg die Durchlässigkeit des glomerulären Filters für Albumin an. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Albuminfiltration durch eine verstärkte Rückresorption im proximalen Tubulus kompensiert wird, wurde die Proteinausscheidung im Urin gemessen und auf die jeweilige Urinosmolarität bezogen. Im Folgenden wurde die Proteinausscheidung als Protein-Osmolaritätsquotient ausgedrückt. Die Proteinausscheidung betrug basal $0,81 \pm 0,27$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=10) und stieg 20 Minuten nach Verabreichung der Hyaluronidase auf $1,41 \pm 0,38$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=10, p=0,001) an (Abbildung 14).

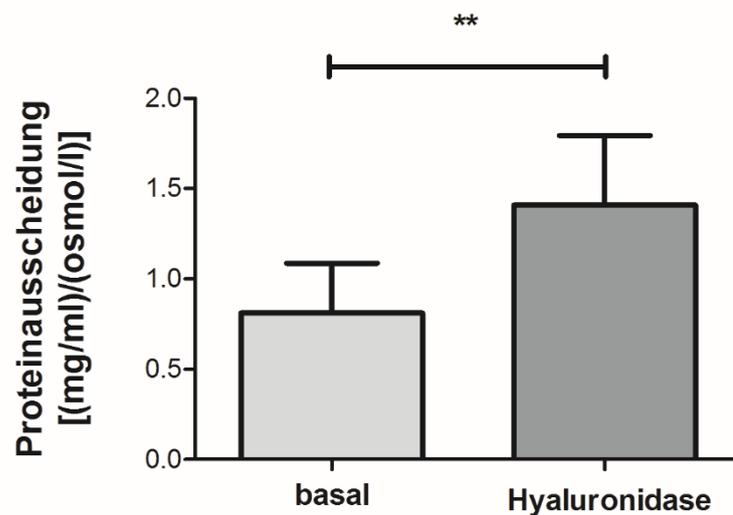


Abbildung 14: Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Proteinausscheidung im Urin: Die Proteinausscheidung stieg 20 Minuten nach Verabreichung der Hyaluronidase an (** zeigt p=0,001).

4.3.3 Proteindifferenzierung im Urin nach Verabreichung des Enzyms Hyaluronidase

Im vorigen Versuch wurde gezeigt, dass die Gesamtproteinausscheidung im Urin nach Verabreichung des Enzyms Hyaluronidase anstieg. Um eine Identifizierung der ausgeschiedenen Proteine zu ermöglichen, wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS-Page-Gelelektrophorese getrennt. Nach Hyaluronidase-Applikation war die Albuminbande ausgeprägter als die basale Bande (Abbildung 15).

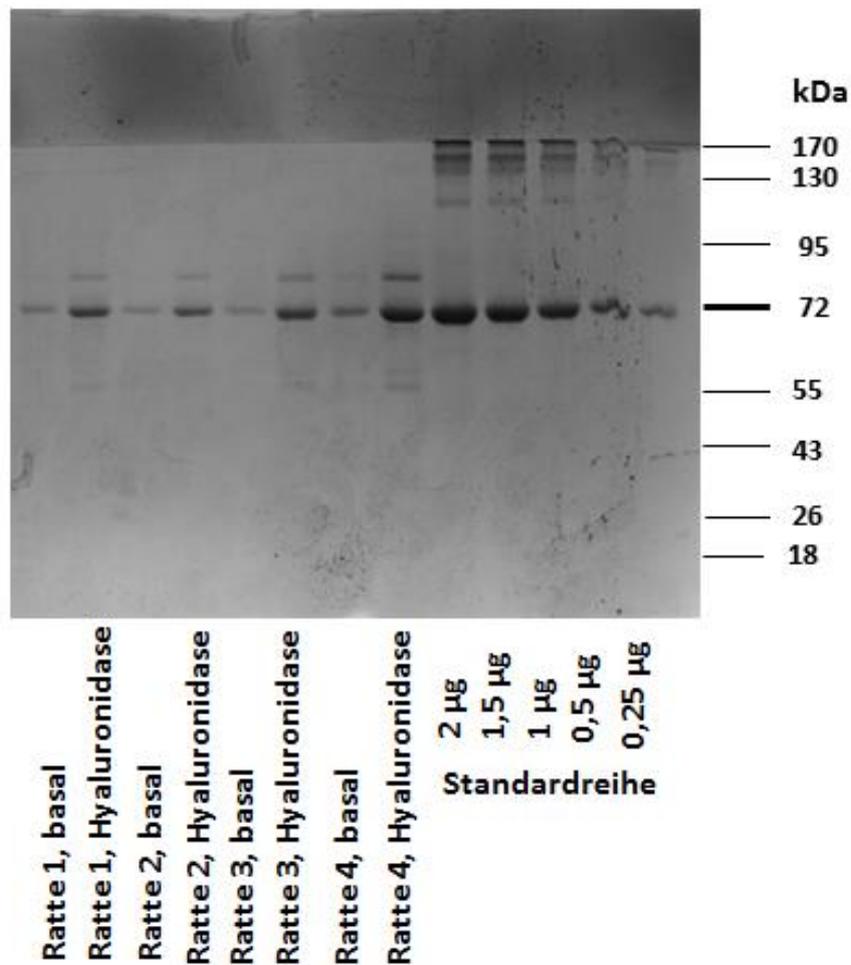


Abbildung 15: Proteindifferenzierung mittels eines Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Page Gels nach Hyaluronidase-Applikation: Nach Hyaluronidase-Applikation war die Albuminbande ausgeprägter als die basale Bande. Die Albuminmenge der Standards betrug 2; 1,5; 1; 0,5 und 0,25 µg.

4.3.4 Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Albuminausscheidung im Urin

Mit Hilfe der SDS-Page Gelelektrophorese konnte dargestellt werden, dass die Albuminausscheidung nach Verabreichung des Enzyms Hyaluronidase anstieg. Die Quantifizierung der Albuminkonzentration in den gewonnenen Urinproben erfolgte mittels eines ELISAS. Die Albuminausscheidung wird im Folgenden als Albumin-Osmolaritätsquotient ausgedrückt. Die Albuminausscheidung im Urin betrug basal $0,05 \pm 0,015$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=5) und stieg 20 Minuten nach Verabreichung der Hyaluronidase auf $0,15 \pm 0,045$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=5, p=0,03) an (Abbildung 16). Der Anstieg der Albuminausscheidung im Urin zeigt, dass die erhöhte Albuminfiltration nicht durch eine verstärkte proximal-tubuläre Rückresorption kompensiert werden konnte.

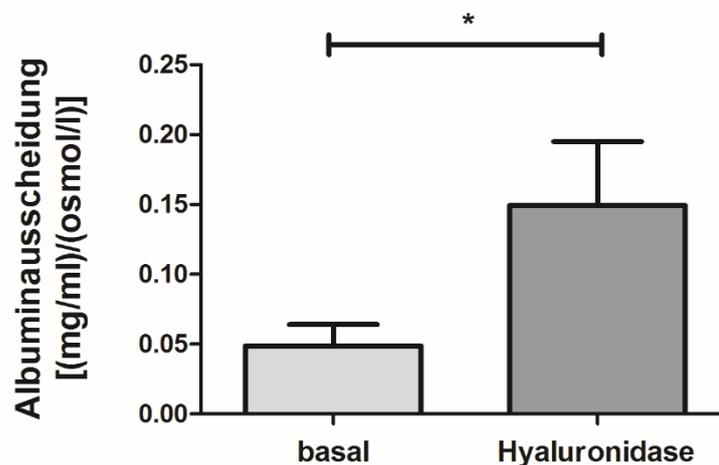


Abbildung 16: Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Albuminausscheidung im Urin: Die Albuminausscheidung stieg 20 Minuten nach Verabreichung der Hyaluronidase an (* zeigt p= 0,03).

Nach Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch das Enzym Hyaluronidase stiegen sowohl der Siebkoeffizient für Albumin als auch die Albuminausscheidung im Urin an.

4.4 Auswirkungen einer klinisch manifesten Proteinurie auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

4.4.1 Verlauf der Proteinausscheidung im Urin von MWF Ratten mit zunehmendem Alter

Die aufgrund der bisherigen Ergebnisse aufgestellte Hypothese, dass eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx zu einer klinisch manifesten Proteinurie führt, wurde mit Hilfe von Munich Wistar Froemter Ratten überprüft. Laut Literaturangaben werden männliche Tiere dieses Stammes mit zunehmendem Alter proteinurisch (Hackbarth et al. 1991; Remuzzi et al. 1988). Dies wurde überprüft, indem von männlichen MWF Ratten über den Zeitraum eines Jahres, in regelmäßigen Abständen von 8–10 Wochen, Urinproben gesammelt und die Proteinausscheidung bestimmt wurde. Diese stieg, wie in Abbildung 17 dargestellt, mit fortschreitendem Lebensalter linear an ($p=0,0003$, $r^2=0,8$).

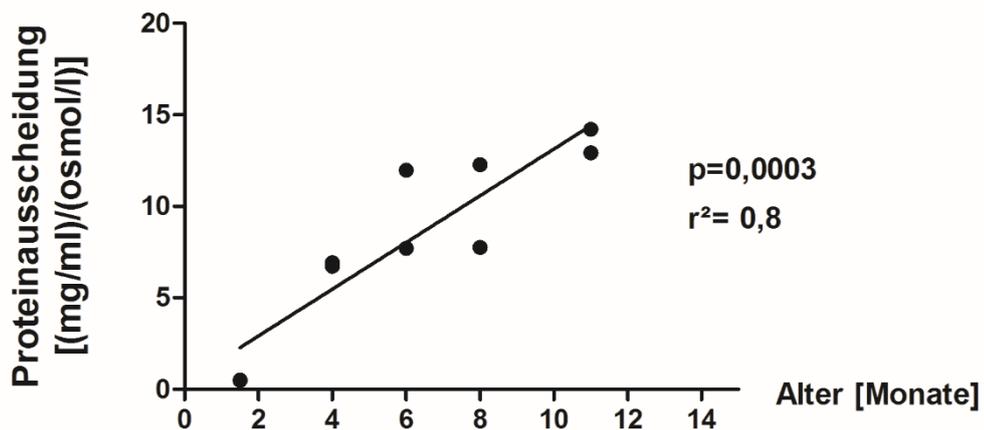


Abbildung 17: Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin von heranwachsenden MWF Ratten: Die Proteinausscheidung stieg mit zunehmendem Alter linear an.

Diese Daten zeigen, dass alte männliche MWF Ratten als ein pathologisches Modell für eine erhöhte Proteinausscheidung im Urin verwendet werden können.

4.4.2 Auswirkungen einer klinisch manifesten Proteinurie auf die endotheliale Glykokalyx

Um die Hypothese zu prüfen, dass die Struktur und Funktion der endothelialen Glykokalyx für die Entwicklung einer Proteinurie mit zunehmendem Alter ursächlich ist, wurde die Dichte der endothelialen Glykokalyx über den Zeitraum eines Jahres (alle 8-10 Wochen) gemessen und überprüft, ob sie mit dem Proteingehalt im Urin korreliert. Wie in Abbildung 18 dargestellt, nahm die Dichte der endothelialen Glykokalyx mit zunehmendem Alter der Tiere ab.

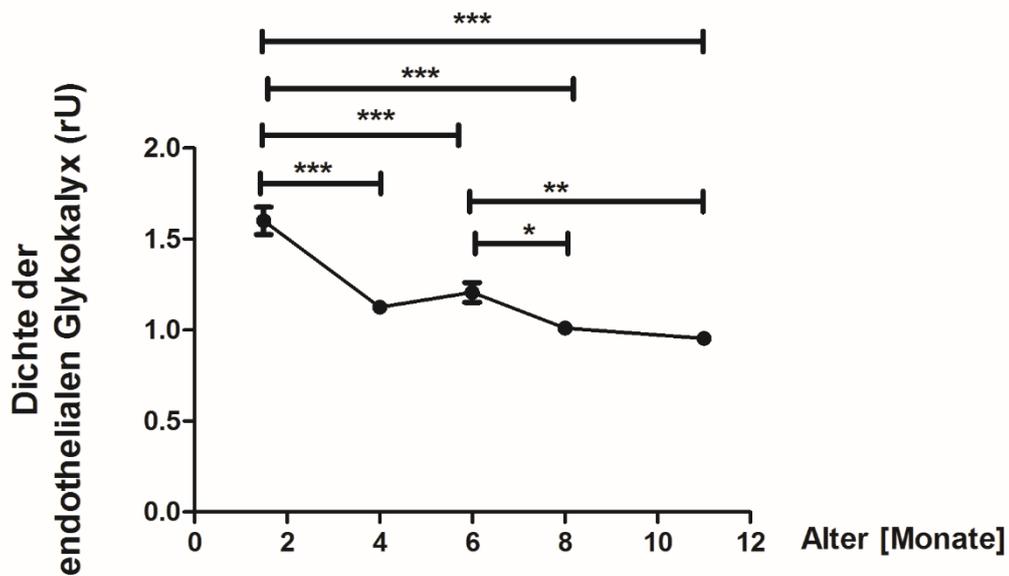


Abbildung 18: Dichte der endothelialen Glykokalyx in heranwachsenden MWF Ratten über den Zeitraum eines Jahres: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx sank mit zunehmendem Alter (* zeigt $p \leq 0,05$, ** zeigt $p < 0,01$, *** zeigt $p \leq 0,001$).

Die Abbildung 19 zeigt, dass bei abnehmender Dichte der endothelialen Glykokalyx die Proteinausscheidung im Urin anstieg ($p=0,0009$, $r^2=0,76$).

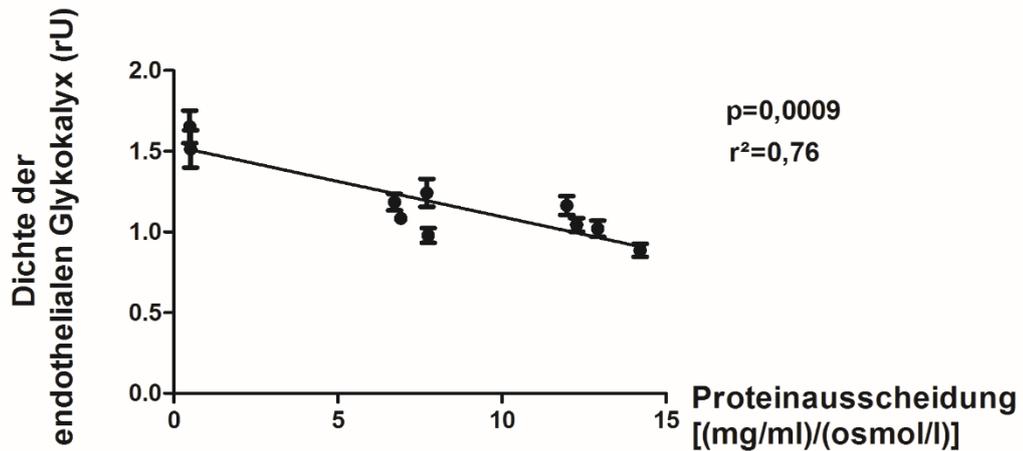


Abbildung 19: Korrelation zwischen der Dichte der endothelialen Glykokalyx und der Proteinausscheidung im Urin: Mit abnehmender Dichte der endothelialen Glykokalyx stieg die Proteinausscheidung an.

4.4.3 Wistar Ratten als nicht proteinurisches Modell

Als Kontrollgruppe wurden Wistar Ratten verwendet, da dieser Stamm mit fortschreitendem Alter keine Proteinurie entwickelt. Dies wurde in der Abbildung 20 dargestellt.

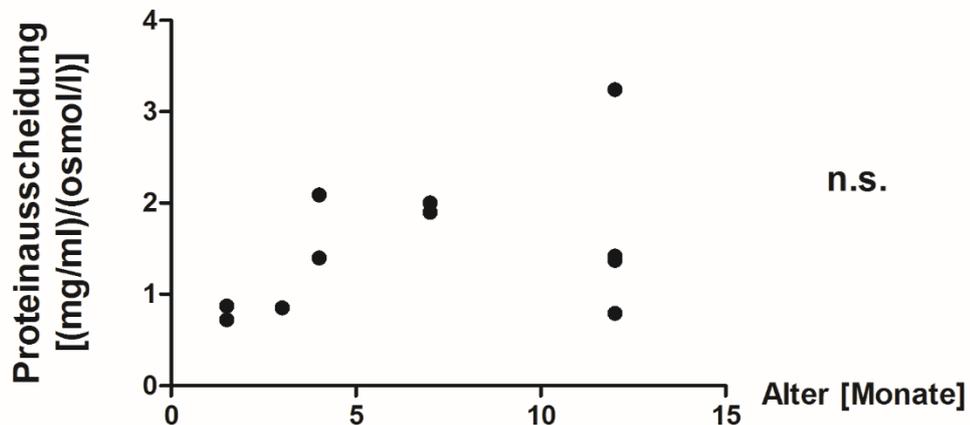


Abbildung 20: Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin von heranwachsenden Wistar Ratten: Die Proteinausscheidung im Urin blieb über den Zeitraum eines Jahres unverändert.

Die Dichte der endothelialen Glykokalyx blieb, wie in Abbildung 21 dargestellt, über den Zeitraum eines Jahres ebenfalls unverändert.

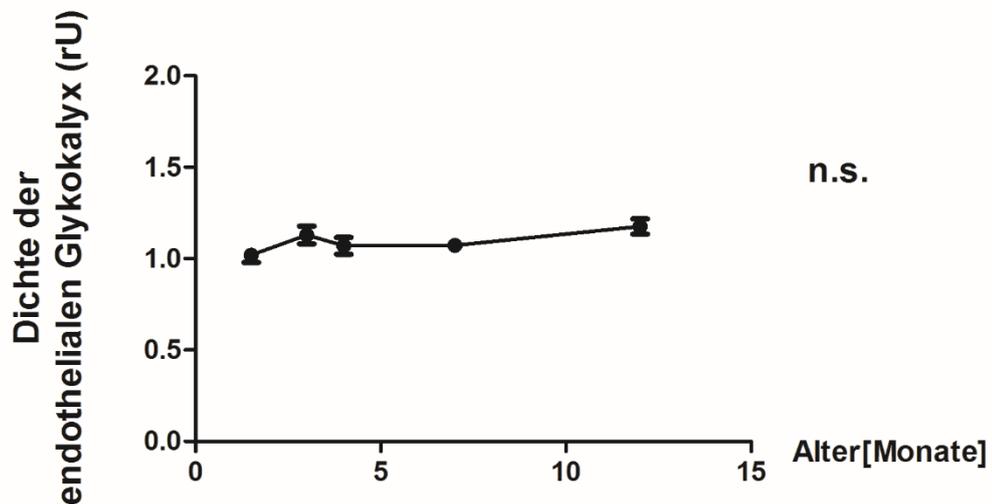


Abbildung 21: Dichte der endothelialen Glykokalyx in heranwachsenden Wistar Ratten über den Zeitraum eines Jahres: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx blieb über den Zeitraum eines Jahres unverändert.

Hiermit konnte die Hypothese einer bestehenden Korrelation zwischen der Dichte der endothelialen Glykokalyx und der Proteinausscheidung im Urin bestätigt werden.

4.5 Auswirkungen eines Hypertonus auf die glomeruläre Filtrationsbarriere, insbesondere auf die endotheliale Glykokalyx

Hypertonie führt zu Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere und geht häufig mit einer Albuminurie einher. Deshalb sollte durch die im Folgenden beschriebenen Experimente geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Durchlässigkeit für Albumin und der Struktur der endothelialen Glykokalyx besteht.

4.5.1 Auswirkungen von Angiotensin II auf die Proteinausscheidung im Urin

Daten in der Literatur legen nahe, dass Angiotensin II (AngII) sowohl den Blutdruck als auch den Siebkoeffizienten für Albumin erhöht (Schießl 2014). Um zu überprüfen, ob die erhöhte Albuminfiltration durch eine verstärkte Rückresorption im proximalen Tubulus kompensiert wird, wurde die Proteinausscheidung im Urin gemessen. Die Proteinausscheidung betrug, wie in Abbildung 22 dargestellt, basal $0,73 \pm 0,255$ (mg/ml)/(osmol/l) (n=11) und stieg 20 Minuten nach AngII-Infusion auf $1,34 \pm 0,184$ (mg/ml)/(osmol/l) (n=11, p=0,008) an.

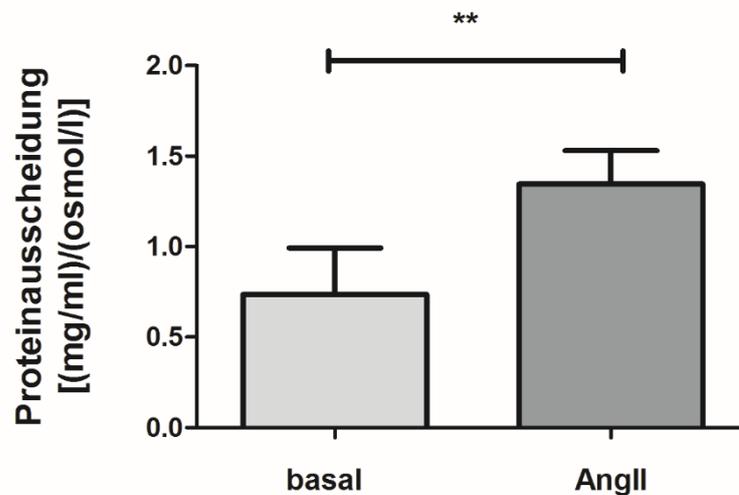


Abbildung 22: Auswirkungen von Angiotensin II auf die Proteinausscheidung im Urin: Die Proteinausscheidung stieg 20 Minuten nach AngII-Infusion an (** zeigt p=0,008).

4.5.2 Proteindifferenzierung im Urin nach Angiotensin II-Infusion

Der basal und nach AngII-Infusion gesammelte Urin wurde mittels SDS-Page-Gelelektrophorese densitometrisch analysiert. Nach AngII-Infusion war die Albuminbande verstärkter ausgeprägt als die basale Bande (Abbildung 23).

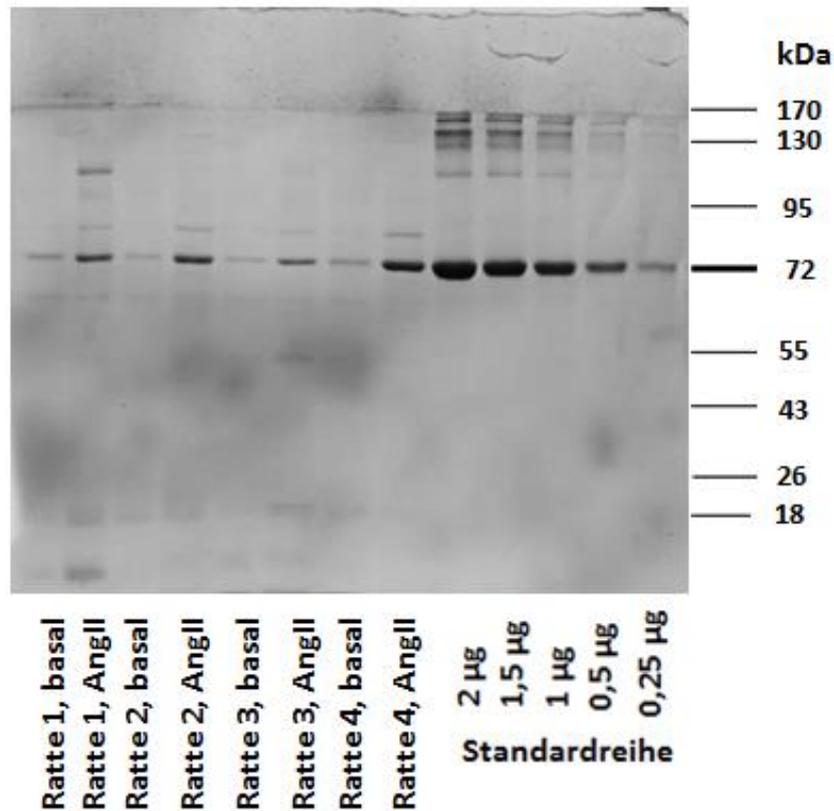


Abbildung 23: Proteindifferenzierung mittels eines Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Page Gels nach AngII-Infusion: Nach AngII-Infusion war die Albuminbande verstärkter ausgeprägt als die basale Bande. Die Albuminmenge der Standards betrug 2; 1,5; 1; 0,5 und 0,25 µg.

4.5.3 Auswirkungen von Angiotensin II auf die Albuminausscheidung im Urin

Die Quantifizierung der Albuminkonzentration in den gewonnenen Urinproben erfolgte anschließend mittels eines ELISAS. Die Albuminausscheidung im Urin betrug basal $0,05 \pm 0,028$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=4) und stieg 20 Minuten nach AngII-Infusion auf $0,23 \pm 0,053$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=4, p=0,04) an (Abbildung 24). Der Anstieg der Albuminausscheidung im Urin zeigt, dass die erhöhte Albuminfiltration nicht durch eine verstärkte Rückresorption des proximalen Tubulus kompensiert werden konnte.

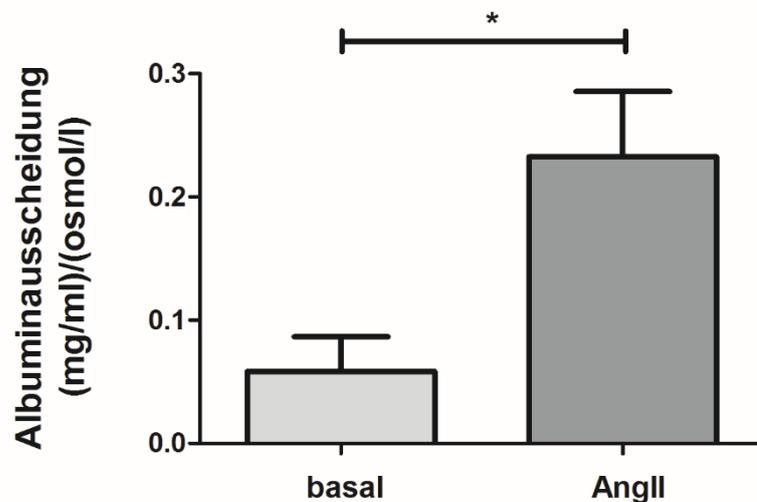


Abbildung 24: Auswirkungen von Angiotensin II auf die Albuminausscheidung im Urin: Die Albuminausscheidung stieg 20 Minuten nach AngII-Infusion an (* zeigt p=0,04).

4.5.4 Auswirkungen von Angiotensin II auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

Es stellte sich die Frage, inwieweit AngII Auswirkungen auf die endotheliale Glykokalyx hat und ob die erhöhte Durchlässigkeit für Albumin aus einer geschädigten endothelialen Glykokalyx resultiert. Die mittlere basale Dichte der endothelialen Glykokalyx betrug $1,35 \pm 0,043$ rU (n=20). Die AngII-Infusion wurde über 20 Minuten so dosiert, dass der mittlere Blutdruck im Schnitt um 30 mmHg bzw. 60 mmHg anstieg. Die mittlere Dichte der endothelialen Glykokalyx sank nach einem Blutdruckanstieg um 30 mmHg auf $1,20 \pm 0,042$ rU (n=24) und nach einem Blutdruckanstieg um 60 mmHg auf $1,12 \pm 0,022$ rU (n=20). Die Höhe des Blutdruckanstiegs

hatte keinen verändernden Einfluss auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx (Abbildung 25).

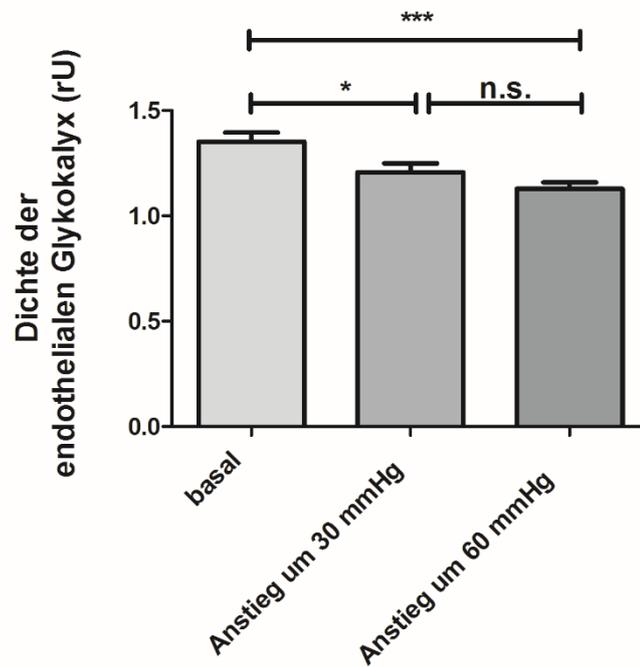


Abbildung 25: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach Erhöhung des Blutdrucks durch AngII-Infusion: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx sank sowohl bei einem Blutdruckanstieg um 30 mmHg also auch bei einem Anstieg um 60 mmHg. Die Höhe des Anstiegs hatte keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx (* zeigt $p \leq 0,05$, *** zeigt $p \leq 0,001$).

4.5.5 Auswirkungen von Noradrenalin auf die glomeruläre Filtrationsbarriere

Um zu beurteilen, ob die Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere hämodynamisch bedingt sind, wurde der Blutdruck bei Tieren einer weiteren Versuchsgruppe durch Noradrenalin erhöht. Die dabei gewonnenen Daten wurden mit den nach AngII-Infusion erhobenen Daten verglichen.

4.5.5.1 Auswirkungen von Noradrenalin auf den Siebkoeffizienten für Albumin

Um die Auswirkungen einer Blutdruckerhöhung durch Noradrenalin auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin zu ermitteln, wurde zunächst der basale Siebkoeffizient für Albumin bestimmt. Dieser betrug $0,02 \pm 0,005$ ($n=10$). Nach 20-minütiger Noradrenalin-Infusion stieg er auf $0,04 \pm 0,016$ ($n=10$, $p=0,004$) an (Abbildung 26). Um anästhesiebedingte Veränderungen des Siebkoeffizienten für Albumin und mögliche zeitabhängige Veränderungen der Farbstoffintensität und der damit korrelierenden Albuminkonzentration auszuschließen, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Der Siebkoeffizient der Negativkontrolle blieb hierbei unverändert.

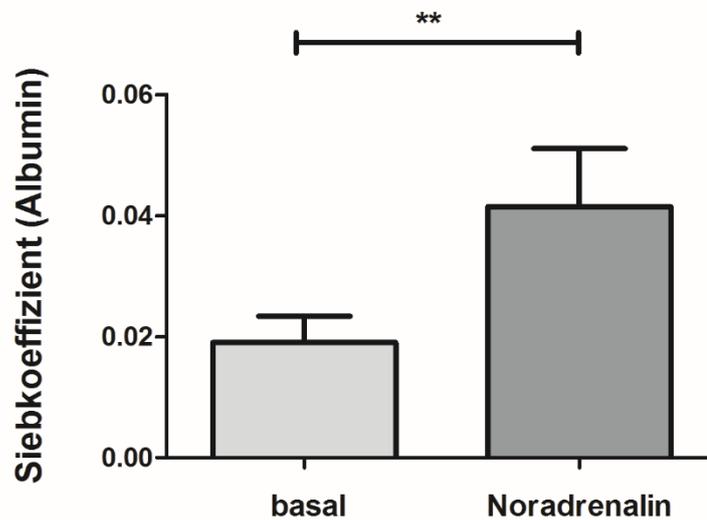


Abbildung 26: Auswirkungen einer Blutdruckerhöhung durch Noradrenalin-Infusion auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin: Der Siebkoeffizient für Albumin stieg 20 Minuten nach Noradrenalin-Infusion an (** zeigt $p=0,004$).

4.5.5.2 Auswirkungen von Noradrenalin auf die Proteinausscheidung im Urin

Um zu überprüfen, ob der proximale Tubulus die erhöhte Albuminfiltration durch eine verstärkte Rückresorption kompensiert, wurde die Proteinausscheidung im Urin gemessen. Die Gesamte Proteinausscheidung im Urin betrug basal $0,9 \pm 0,145$ (mg/ml)/(osmol/l) (n=14) und stieg 20 Minuten nach Noradrenalin-Infusion auf $2,12 \pm 0,29$ (mg/ml)/(osmol/l) (n=14, $p < 0,0001$) an (Abbildung 27).

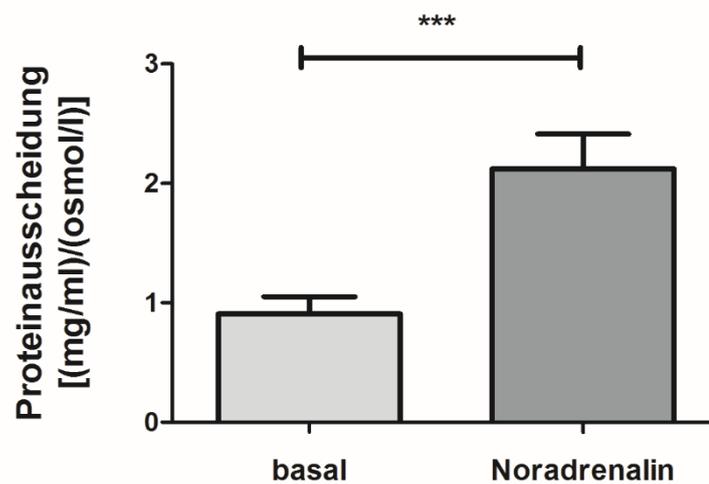


Abbildung 27: Auswirkungen einer Blutdruckerhöhung durch Noradrenalin auf die Proteinausscheidung im Urin: Die Proteinausscheidung stieg 20 Minuten nach Noradrenalin-Infusion an (***) zeigt $p < 0,0001$).

4.5.5.3 Proteindifferenzierung im Urin nach Noradrenalin-Infusion

Im vorhergehenden Versuch wurde gezeigt, dass die Gesamtproteinausscheidung im Urin nach Noradrenalin-Infusion anstieg. Anschließend wurden sie nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS-Page-Gelelektrophorese getrennt. Die Albuminbande nach Noradrenalin-Infusion war ausgeprägter als die basale Bande (Abbildung 28).

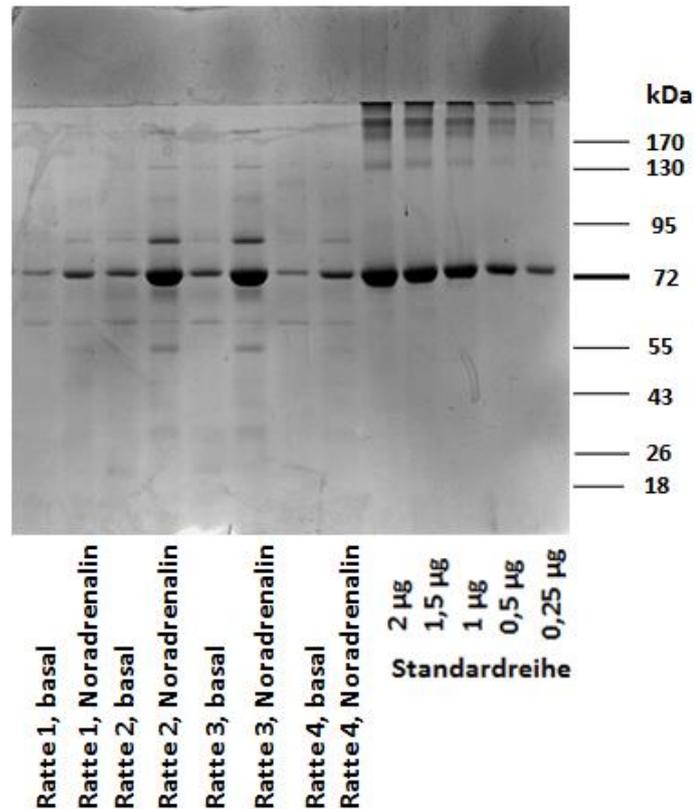


Abbildung 28: Proteindifferenzierung mittels eines Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Page Gels nach Noradrenalin-Infusion: Die Albuminbande nach Noradrenalin-Infusion war ausgeprägter als die basale Bande. Die Albuminmenge der Standards betrug 2; 1,5; 1; 0,5 und 0,25 µg.

4.5.5.4 Auswirkungen von Noradrenalin auf die Albuminausscheidung im Urin

Die Quantifizierung des Albuminanstiegs nach Noradrenalin-Infusion erfolgte anschließend mittels eines ELISAS. Die Albuminausscheidung im Urin betrug basal $0,11 \pm 0,011$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=5). 20 Minuten nach Noradrenalin-Infusion stieg sie auf $0,71 \pm 0,123$ ((mg/ml)/(osmol/l)) (n=5, $p=0,007$) an (Abbildung 29). Der Anstieg der Albuminausscheidung im Urin zeigt, dass die erhöhte Albuminfiltration nicht durch eine verstärkte proximal-tubuläre Rückresorption kompensiert werden konnte.

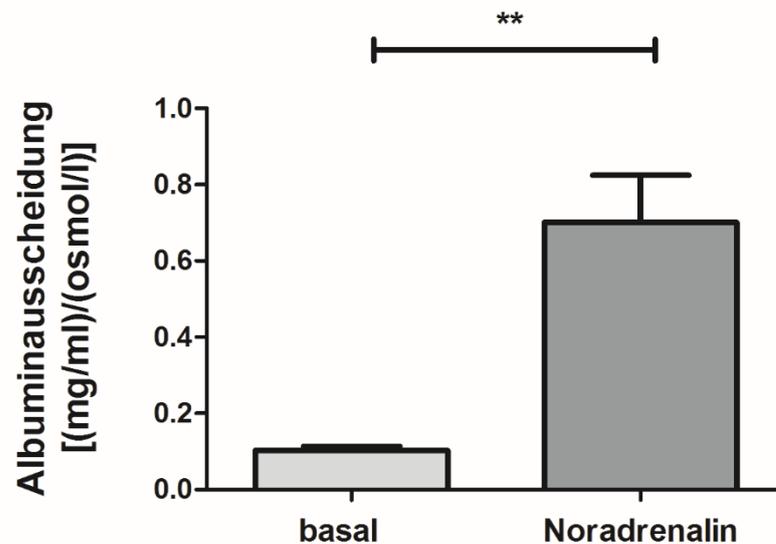


Abbildung 29: Auswirkungen von Noradrenalin auf die Albuminausscheidung im Urin: Die Albuminausscheidung stieg 20 Minuten nach Noradrenalin-Infusion an (** zeigt $p=0,007$).

4.5.5.5 Auswirkungen von Noradrenalin auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx

Da im vorigen Versuch gezeigt wurde, dass Noradrenalin die Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere für Albumin erhöht, stellte sich die Frage, inwieweit Noradrenalin einen Effekt auf die endotheliale Glykokalyx hat und ob die erhöhte Durchlässigkeit für Albumin aus einer geschädigten endothelialen Glykokalyx resultiert.

Die mittlere basale Dichte der endothelialen Glykokalyx betrug $1,84 \pm 0,089$ rU (n=19). Die Noradrenalin-Infusion wurde über 20 Minuten so dosiert, dass der mittlere Blutdruck im Schnitt um 30 mmHg bzw. 60 mmHg anstieg. Die mittlere Dichte der endothelialen Glykokalyx sank nach einem Blutdruckanstieg um 30 mmHg auf $1,35 \pm 0,046$ rU (n=19) und nach einem

Blutdruckanstieg um 60 mmHg auf $1,23 \pm 0,02$ rU (n=19). Die Höhe des Blutdruckanstiegs hatte keinen Einfluss auf die Intensitätsveränderung der endothelialen Glykokalyx (Abbildung 30).

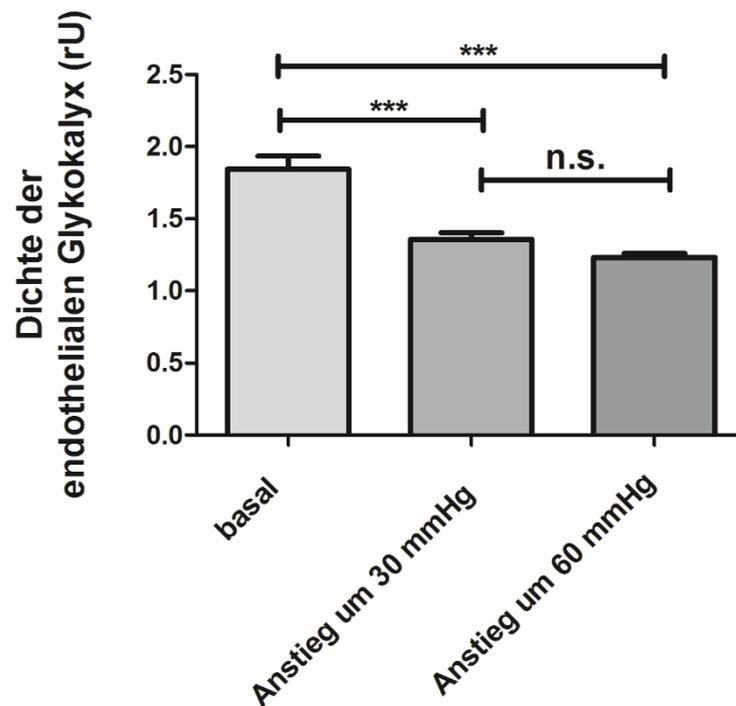


Abbildung 30: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach Erhöhung des Blutdrucks durch Noradrenalin-Infusion: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx sank sowohl bei einem Blutdruckanstieg um 30 mmHg also auch bei einem Anstieg um 60 mmHg. Die Höhe des Anstiegs hatte keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx (***) zeigt $p \leq 0,001$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl Angiotensin II als auch Noradrenalin die glomeruläre Filtrationsbarriere in ihrer Permeabilität beeinflussen. Sowohl nach AngII- als auch nach Noradrenalin-Infusion stieg die Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere für Albumin an. Der Anstieg der Albuminausscheidung im Urin nach Infusion von AngII bzw. Noradrenalin zeigt, dass die erhöhte Albuminfiltration nicht durch eine verstärkte proximal-tubuläre Rückresorption kompensiert werden konnte. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx nahm sowohl nach AngII- als auch nach Noradrenalin-Infusion ab, wobei die Höhe des Blutdruckanstiegs nicht mit unterschiedlichen Veränderungen der endothelialen Dichte korrelierte.

4.6 Einfluss auf die verschiedenen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx durch Hyaluronidase, Angiotensin II und Noradrenalin

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass nach Gabe der Hyaluronidase der Siebkoeffizient für Albumin, der ein Maß für die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere ist, anstieg. Das Enzym Hyaluronidase schädigt nachweislich die Struktur der endothelialen Glykokalyx, was deren essentielle Rolle in der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere verdeutlicht. Die Integrität des glomerulären Filters und die Dichte der endothelialen Glykokalyx nahmen sowohl nach AngII als auch nach Noradrenalin ab. Um die Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Struktur der endothelialen Glykokalyx besser verstehen zu können, sollten die einzelnen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx untersucht werden. Hierzu wurden zunächst basale Urin- und Plasmaproben gesammelt, die mit den später gewonnenen Proben verglichen werden sollten. Es wurden drei verschiedene Bestandteile der endothelialen Glykokalyx untersucht: Syndekan1, Heparansulfat und Hyaluronidase. Syndekan1 sollte näher bestimmt werden, da es maßgeblich für die Bildung des Fundaments der endothelialen Glykokalyx verantwortlich ist. Heparansulfat stellt die Hauptfraktion der an die Proteoglykane angelagerten Glykosaminoglykane dar und wurde deshalb gezielt untersucht. Hyaluronsäure ist das einzige Glykosaminoglykan, das nicht über ein Proteoglykan an der Zellmembran gebunden ist.

4.6.1 Syndekan1

4.6.1.1 Urin

Um die Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf das Proteoglykan Syndekan1 genauer untersuchen zu können, wurde zunächst die basale Syndekan1-Konzentration im Urin bestimmt. Nach Applikation der Substanz, die jeweils untersucht werden sollte, wurde die Konzentration von Syndekan1 erneut gemessen und mit den basalen Werten verglichen.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, stieg die Urinkonzentration von Syndekan1 nach Verabreichung der Hyaluronidase von $2,89 \pm 0,56$ ng/ml ($n=27$) auf $134,07 \pm 31,35$ ng/ml ($n=8$, $p < 0,0001$), nach AngII-Infusion auf $58,622 \pm 10,67$ ng/ml ($n=8$, $p < 0,0001$) und nach Noradrenalin-Infusion auf $101,335 \pm 17,33$ ng/ml ($n=11$, $p < 0,0001$) an.

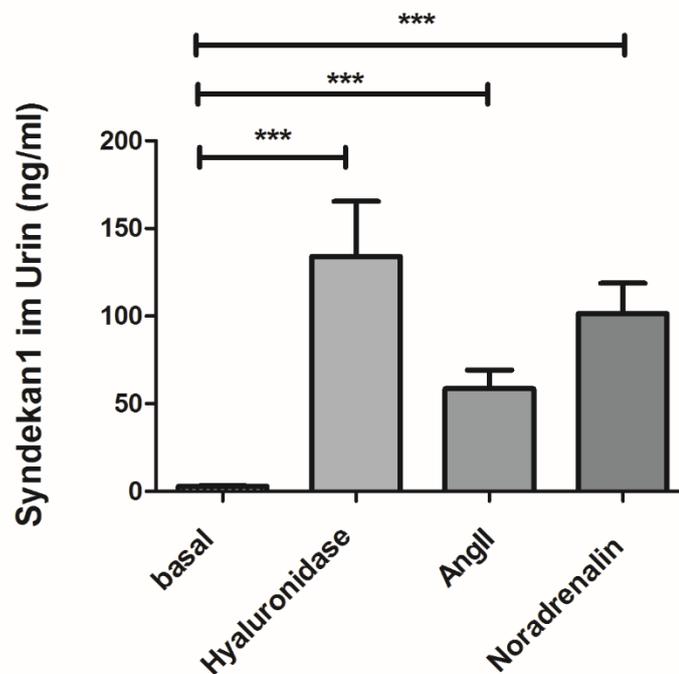


Abbildung 31: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Syndekan1-Konzentration im Urin: Die Syndekan1-Konzentration im Urin stieg nach Behandlung mit Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin an (***) zeigt $p < 0,0001$).

4.6.1.2 Plasma

Die Abbildung 32 zeigt, dass die Konzentration von Syndekan1 im Plasma nach Verabreichung der Hyaluronidase von $19,99 \pm 1,97$ ng/ml ($n=16$) auf $43,21 \pm 1,32$ ng/ml ($n=5$, $p < 0,0001$) anstieg. Nach AngII-Infusion stieg die Syndekan1-Konzentration auf $63,56 \pm 2,78$ ng/ml ($n=6$, $p < 0,0001$) und nach Noradrenalin-Infusion auf $51,04 \pm 3,02$ ng/ml ($n=5$, $p < 0,0001$) an.

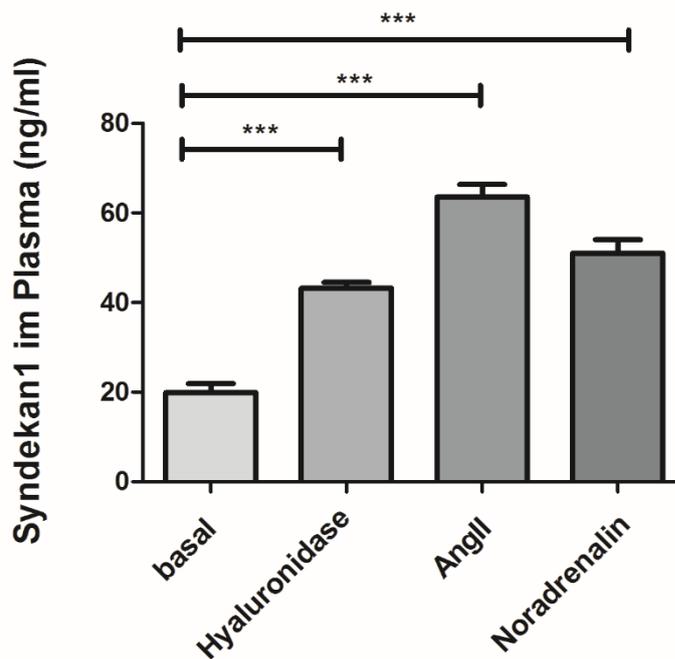


Abbildung 32: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Syndekan1-Konzentration im Plasma: Die Syndekan1-Konzentration im Plasma stieg nach Behandlung mit Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin an (***) zeigt $p < 0,0001$).

4.6.2 Heparansulfat im Urin

Wie in Abbildung 33 gezeigt, stieg die Urinkonzentration von Heparansulfat nach Verabreichung der Hyaluronidase von $660,11 \pm 66,92$ ng/ml ($n=31$) auf $1740,47 \pm 217,44$ ng/ml ($n=10$, $p < 0,0001$). Nach AngII-Infusion stieg die Konzentration auf $2119,58 \pm 393,41$ ng/ml ($n=10$, $p < 0,0001$) und nach Noradrenalin-Infusion auf $2296,69 \pm 284,46$ ng/ml ($n=11$, $p < 0,0001$) an.

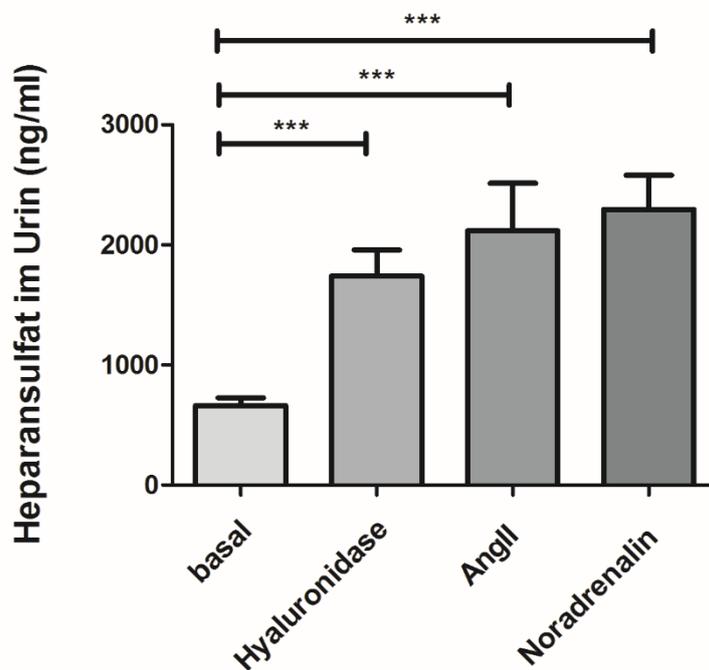


Abbildung 33: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Heparansulfat-Konzentration im Urin: Die Heparansulfat-Konzentration im Urin stieg nach Behandlung mit Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin an (***) zeigt $p < 0,0001$).

4.6.3 Hyaluronsäure

4.6.3.1 Urin

Die Urinkonzentration von Hyaluronsäure sank nach Verabreichung der Hyaluronidase von $46,21 \pm 4,11$ (n=28) auf $22,51 \pm 6,35$ ng/ml (n=8, p=0,008). Nach AngII-Infusion blieb die Konzentration unverändert bei $36,07 \pm 6,06$ ng/ml (n=9) und nach Noradrenalin-Infusion sank sie auf $23,22 \pm 3,59$ ng/ml (n=11, p=0,002) (Abbildung 34).

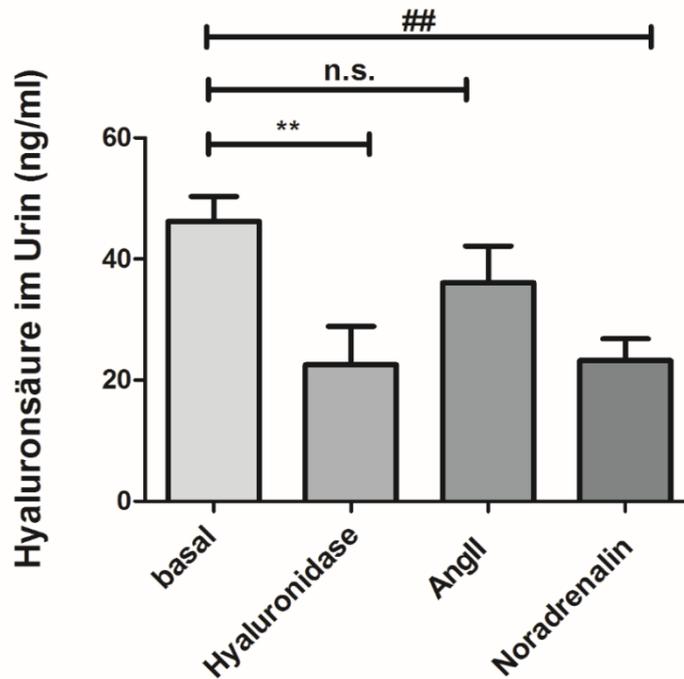


Abbildung 34: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Hyaluronsäure-Konzentration im Urin: Die Hyaluronsäure-Konzentration im Urin nahm nach Behandlung mit Hyaluronidase und Noradrenalin ab, während sie nach AngII-Infusion unverändert blieb (** zeigt p=0,008, ## zeigt p=0,002).

4.6.3.2 Plasma

Die Abbildung 35 zeigt, dass die Konzentration von Hyaluronsäure im Plasma nach Verabreichung der Hyaluronidase von $865,79 \pm 93,07$ ng/ml ($n=19$) auf $11,31 \pm 7,039$ ng/ml ($n=6$, $p < 0,0001$) abfiel. Nach AngII Infusion blieb die Hyaluronsäure-Konzentration unverändert bei $569,61 \pm 234,24$ ng/ml ($n=6$) und nach Noradrenalin-Infusion sank sie auf $26,22 \pm 14,21$ ng/ml ($n=7$, $p < 0,0001$).

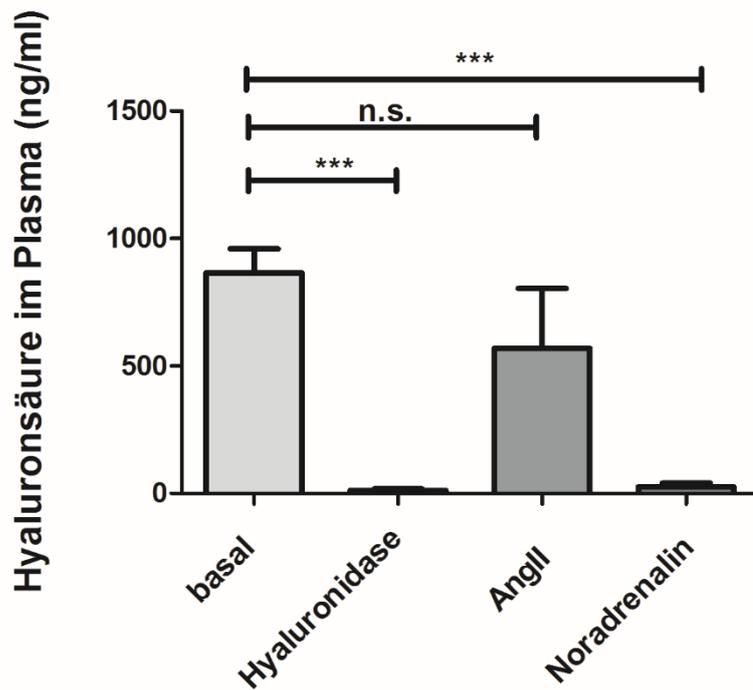


Abbildung 35: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Hyaluronsäure-Konzentration im Plasma: Die Hyaluronsäure-Konzentration im Plasma sank nach Behandlung mit Hyaluronidase und Noradrenalin, während sie nach AngII-Infusion unverändert blieb (***) zeigt $p < 0,0001$).

4.7 Beeinflussung der endothelialen Glykokalyx in vitro

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass eine akute Schädigung proximaler Tubuluszellen eine erhöhte Albuminfiltration über die glomeruläre Filtrationsbarriere zur Folge hat. Es muss also eine Kommunikation zwischen dem tubulären System und dem glomerulären Filter vorliegen, die die Permeabilität der Filtrationsbarriere beeinflussen kann. Vorstellbar wäre eine stromabwärts vermittelte Kommunikation über die osmosensorischen Macula-densa-Zellen, die über einen Feedbackmechanismus die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, dass Macula-densa Zellen möglicherweise Substanzen aus dem abgeschilferten Material, das durch eine akute Zellschädigung im proximalen Tubulus entsteht, detektieren und anschließend selbst Substanzen freisetzen, die wiederum über eine tubulo-glomeruläre Kommunikation die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflussen.

Der Fokus wurde zunächst auf den zweiten Teil dieser Hypothese gelegt und mögliche Substanzen, die eine tubulo-glomeruläre Kommunikation vermitteln und die Filtrationsbarriere beeinflussen können, untersucht. Sowohl Adenosintriphosphat (ATP) als auch Stickstoffmonoxid (NO) werden im juxtaglomerulären Apparat synthetisiert und besitzen vasoaktive Eigenschaften. Adenosin entsteht durch Dephosphorylierung des ATPs. Diese drei Substanzen sollten in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Der Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere nach Schädigung von proximalen Tubuluszellen ging mit einem Verlust der Dichte der endothelialen Glykokalyx einher. Deshalb sollten zunächst die direkten Auswirkungen dieser drei Substanzen auf die endotheliale Glykokalyx untersucht werden.

4.7.1 Kurzzeitversuche

Den kultivierten Zellen wurde jeweils ATP, Adenosin oder Natriumnitroprussid (SNP), ein Stickstoffmonoxid-Donor, hinzugefügt und nach einer Stunde die Dichte der endothelialen Glykokalyx vermessen. Diese wurde anschließend mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx betrug, wie in Abbildung 36 dargestellt, in der Kontrollgruppe $1,8 \pm 0,03$ rU ($n=165$). Nach einer einstündigen Inkubation mit ATP stieg sie auf $2,45 \pm 0,07$ rU ($n=73$) und nach Adenosin auf $2,27 \pm 0,04$ rU ($n=187$) an. Nach der Inkubation mit SNP blieb die Dichte unverändert bei $1,75 \pm 0,06$ rU ($n=71$).

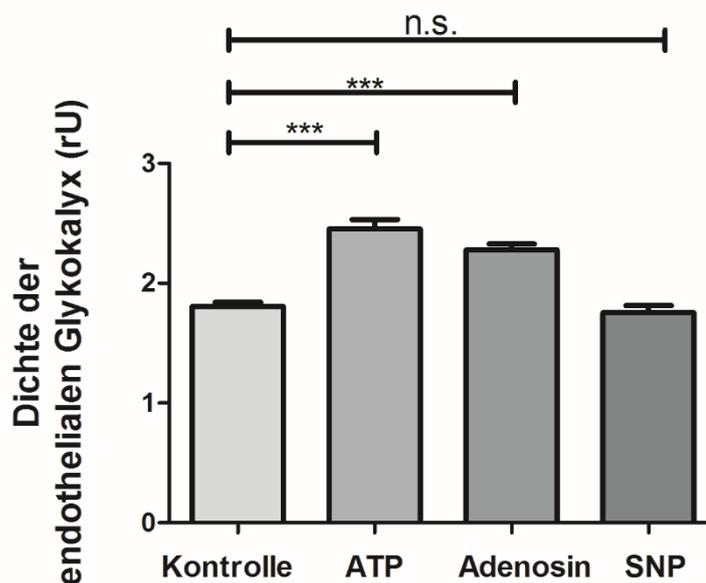


Abbildung 36: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach einstündiger Inkubation der kultivierten Endothelzellen mit ATP, Adenosin und SNP: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx stieg sowohl nach ATP- als auch nach Adenosin-Inkubation an, während sie nach Zugabe von SNP unverändert blieb (***) zeigt $p \leq 0,001$).

4.7.2 Langzeitversuche

Die kultivierten Endothelzellen wurden anschließend mit den gleichen Substanzen für 16 Stunden inkubiert, um zu überprüfen, ob Veränderungen der endothelialen Glykokalyx zeitabhängig sind. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx in der Kontrollgruppe betrug $1,6 \pm 0,02$ rU ($n=212$). Nach 16-stündiger Inkubation stieg sie bei ATP auf $2,3 \pm 0,03$ rU ($n=238$) und bei Adenosin auf $2,16 \pm 0,03$ rU ($n=166$) an. Nach Inkubation mit SNP blieb sie unverändert bei $1,56 \pm 0,02$ rU ($n=176$) (Abbildung 37).

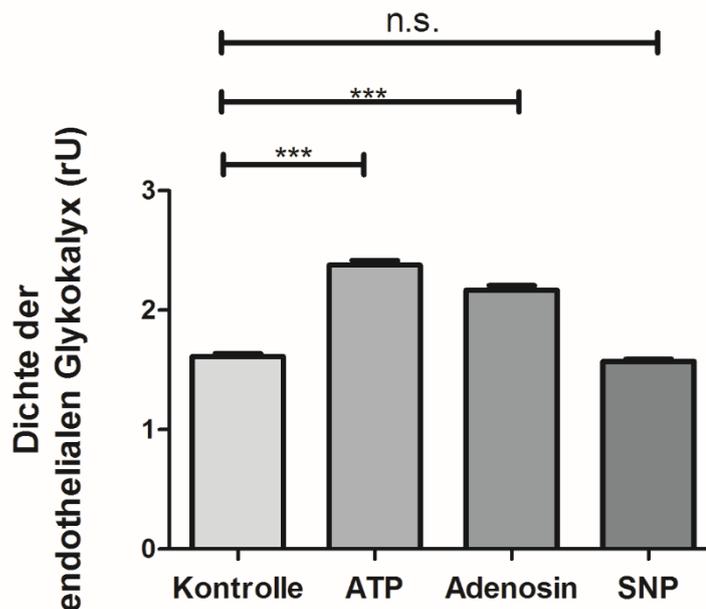


Abbildung 37: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach 16-stündiger Inkubation mit ATP, Adenosin und SNP: Die Dichte der endothelialen Glykokalyx stieg sowohl nach ATP- als auch nach Adenosin-Inkubation an, während sie nach Zugabe von SNP unverändert blieb (***) zeigt $p \leq 0,001$).

Die Dichte der endothelialen Glykokalyx in kultivierten Endothelzellen stieg nach einer Inkubation sowohl mit ATP als auch mit Adenosin an. Nach einer Inkubation mit SNP blieb die Dichte der endothelialen Glykokalyx unverändert. Die unterschiedliche Inkubationszeit hatte keinen Einfluss auf die Messergebnisse.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, sowohl Mechanismen einer tubulo-glomerulären Kommunikation als auch die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die glomeruläre Filtrationsbarriere zu klären. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte mit Hilfe der intravitalem Multiphotonenmikroskopie. Verglichen mit anderen Techniken wie der Mikropunktion oder histologischen Methoden erlaubt die Multiphotonenmikroskopie die simultane Untersuchung sowohl der Morphologie als auch der funktionellen Parameter der Niere. Diese Untersuchungstechnik wurde gewählt, um Versuche unter möglichst physiologischen Bedingungen an lebenden Tieren durchführen zu können. So konnte die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere nach Schädigung des tubulären Systems und die Beeinflussung der endothelialen Glykokalyx mit den Folgen für die Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere genauer untersucht werden.

Da die Glomeruli aufgrund ihrer tiefen Lokalisation in der Nierenrinde von Nagetieren für die Untersuchung nur schwer zugänglich sind (Schießl et al. 2013), wurde für die Experimente der Rattenstamm Munich Wistar Froemter (MWF) gewählt. MWF-Ratten sind durch eine hohe Anzahl an oberflächlich lokalisierten Glomeruli charakterisiert (Hackbarth et al. 1983). Ab einem bestimmten Alter entwickeln männliche MWF-Ratten eine Glomerulosklerose (Remuzzi et al. 1988), leiden unter einem Hypertonus und entwickeln eine Proteinurie (Hackbarth et al. 1991). Deshalb sind besonders alte Männchen dieses Stammes als Modell zur Untersuchung einer Proteinurie geeignet. Junge Tiere oder auch ältere Weibchen eignen sich als physiologisches Modell zur Untersuchung der Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere mit Hilfe der intravitalem Multiphotonenmikroskopie.

5.1 Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

Um die Auswirkungen einer akuten Schädigung einzelner proximaler Tubuluszellen auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Siebkoeffizient für Albumin bestimmt. 20 Minuten nach Schädigung des proximalen Tubulus stieg der Siebkoeffizient für Albumin signifikant im Vergleich zu den basal gemessenen Werten an. Einem erhöhten Siebkoeffizienten liegt neben einem veränderten renalen Plasmafluss auch ein Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zugrunde. Dieser Versuch sollte die Hypothese prüfen, dass Schäden am proximalen Tubulus nicht nur durch die verminderte Reabsorptionsfähigkeit des Tubulussystems zu einer erhöhten

Proteinausscheidung im Urin führen, sondern, dass akute tubuläre Schäden auch per se Einfluss auf die Filtrationsbarriere haben. Nach akuter Schädigung der Tubuluszellen wurde signifikant mehr Albumin filtriert.

Neben der Albuminurie ist eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate ein weiteres klinisch relevantes Symptom (Hanif und Ramphul 2018). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die $snGFR$ blieb nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen unverändert. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde ist, dass die Größe des geschädigten Bereiches variiert. Bei einer akuten Tubulusnekrose sind weitaus größere Areale des tubulären Systems geschädigt, als es in diesem Versuch durch die fokussierte Laserexposition der Fall war. Zudem könnte die klinisch relevante erniedrigte Filtrationsrate auch erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar sein. Aufgrund der Tatsache, dass eine länger andauernde Narkose bei Ratten häufig Blutdruckveränderungen nach sich zieht, wurden die Experimente in der vorliegenden Arbeit auf die Zeitspanne von 30 Minuten begrenzt.

Der Durchmesser des proximalen Tubulus nahm innerhalb von 20 Minuten nach Ablation einzelner Zellen des Tubulus zu. Eine mögliche Erklärung für das vergrößerte Lumen wird in Abbildung 38 diskutiert.

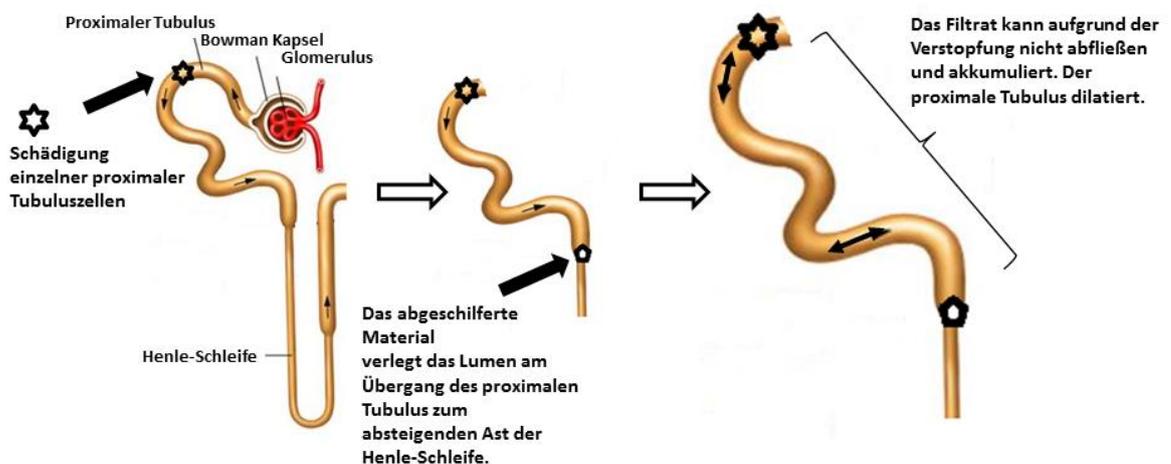


Abbildung 38: Mögliche Erklärung für einen Anstieg des Lumens des proximalen Tubulus nach Schädigung einzelner proximaler Tubuluszellen: Die abgeschilferten Zellen verlegen das Lumen am Übergang des proximalen Tubulus zum absteigenden Ast der Henle-Schleife. Das Filtrat kann nicht vollständig abfließen und dehnt das Lumen des proximalen Tubulus. Abbildung modifiziert nach (Beltina.org).

Durch die Schädigung einzelner Tubuluszellen könnten diese von den übrigen Zellen losgelöst und abgeschilfert werden. Das desquamierte Material fließt mit dem Filtrat stromabwärts. Am

Übergang des proximalen Tubulus zum absteigenden Ast der Henle-Schleife könnte es aufgrund der anatomisch bedingten Lumenverengung zu einer Akkumulation des abgeschilferten Materials kommen, was den Abfluss des Filtrates verhindern würde. Das Filtrat könnte schlechter abfließen und dehnt den proximalen Tubulus, was durch einen erhöhten Durchmesser des Tubulus messbar wird.

In vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die Ablation von einzelnen Tubulusepithelzellen zu einem Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere führt. Die glomeruläre Filtrationseinheit besteht aus drei Komponenten: Dem fenestrierten Endothel mit der endothelialen Glykokalyx, der Basalmembran und den Podozyten. In bisherigen Studien lag das Augenmerk hinsichtlich der Permeabilität der Filtrationsbarriere hauptsächlich auf den Podozyten. Den Podozyten wird bei der Ultrafiltration des Harns eine große Bedeutung beigemessen. Mit ihren Fußfortsätzen bilden sie zum einen die Filtrationsschlitze und zum anderen weisen sie aufgrund der Podocalyxin-Moleküle an ihrer apikalen Zelloberfläche eine starke negative Ladung auf. Beide Aspekte sind entscheidende Faktoren der Filtrationsbarriere hinsichtlich ihrer ladungs- und gröÙenselektiven Eigenschaften (Nielsen und McNagny 2009). Die dritte Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere spielt also eine große Rolle bei der Permeabilität des glomerulären Filters.

Seit einiger Zeit rückt auch die endotheliale Glykokalyx immer mehr in den Fokus der Nierenforschung und wird mit der Entstehung von Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht (Salmon et al. 2012). Ihre essentielle Rolle für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere wurde hinreichend diskutiert (Jeansson und Haraldsson 2006) und ist Bestandteil des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx nahm 20 Minuten nach Ablation einzelner Tubuluszellen signifikant ab. Dies legt nahe, dass akute tubuläre Schäden zum einen Einfluss auf diese Schicht der Filtrationsbarriere haben und, dass die erhöhte Albuminfiltration durch eine verringerte Dichte der endothelialen Glykokalyx bedingt ist.

5.2 Mögliche Mechanismen der tubulo-glomerulären Kommunikation

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass eine akute Schädigung proximaler Tubuluszellen eine erhöhte Albuminfiltration über die glomeruläre Filtrationsbarriere zur Folge hat. Es muss also eine Kommunikation zwischen dem tubulären System und dem glomerulären Filter vorliegen, die die Permeabilität der Filtrationsbarriere beeinflussen kann. Vorstellbar wäre zum einen eine stromabwärts vermittelte Kommunikation über die osmosensorischen Macula-densa-Zellen, die über einen Feedbackmechanismus die Funktion der glomerulären

Filtrationsbarriere beeinflussen. Zum anderen wäre auch eine stromaufwärts gerichtete Kommunikation entlang der tubulären Zellen bis hin zum Glomerulus und zur glomerulären Filtrationsbarriere denkbar.

5.2.1 Macula-densa-Zellen als Vermittler der tubulo-glomerulären Kommunikation

Der tubulo-glomeruläre Feedbackmechanismus sorgt für eine Anpassung der Filtration der einzelnen Nephrone an die tubuläre Resorption. Dieser Feedbackmechanismus basiert auf den osmosensorischen Eigenschaften der Macula-densa-Zellen, die an der Kontaktstelle des distalen Tubulus zu dem zugehörigen Glomerulus im Bereich des juxtaglomerulären Apparats lokalisiert sind. Eine Erklärung könnte deshalb sein, dass die Macula-densa-Zellen bestimmte Substanzen aus dem abgeschilferten Material detektieren und über die anatomische Kontaktstelle zum Glomerulus eine direkte Wirkung auf die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere haben. Neben der Detektion der NaCl-Konzentration sind Macula-densa-Zellen auch in der Lage, verschiedene chemische und metabolische Substanzen zu detektieren (Peti-Peterdi und Harris 2010). Seit kurzer Zeit ist ebenfalls bekannt, dass olfaktorische Rezeptoren in der Niere lokalisiert sind, denen im Hinblick auf die Nierenphysiologie und die gesamte Blutdruckregulation immer größere Aufmerksamkeit zuteilwird. Sowohl das olfaktorische G-Protein (Golf) als auch die Adenylatcyclase3, ohne die Mäuse nachweislich nicht riechen können, werden in der Niere exprimiert. Mit Hilfe von Immunfärbungen konnte gezeigt werden, dass beide in den Macula-densa-Zellen vorhanden sind (Shepard und Pluznick 2016). Bisher ist jedoch noch relativ wenig über die Rolle der olfaktorischen Rezeptoren und auch olfaktorischen Liganden in der Niere bekannt, sodass in naher Zukunft mit Sicherheit noch ergänzende Studien nötig sind, um dieses komplexe System zu verstehen. Auch wenn die zu Grunde liegenden Mechanismen weitgehend unklar sind, könnten sie einen Hinweis auf die Grundlagen einer tubulo-glomerulären Kommunikation darstellen.

5.2.2 Zell-Zell-Kommunikation im tubulären System

Der Signalaustausch zwischen Zellen, auch als interzelluläre Kommunikation bezeichnet, dient dem Austausch von Botenstoffen und Informationen zwischen den Zellen, um die physiologischen und biochemischen Funktionen des Organismus zu regulieren. Die Zelle erkennt das ankommende Signal mit Hilfe eines Rezeptorproteins und wandelt das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres Signal um, das die Reaktion der Zelle steuert (Buselmaier 2009). Signale können über verschiedene Wege übermittelt werden: Bei der

endokrinen Signalübertragung wird das Signal durch den Blutkreislauf im gesamten Körper verteilt. Zudem gibt es eine parakrine Kommunikation, bei der die Signalmoleküle durch das extrazelluläre Medium diffundieren und so in engem Kontakt mit den Zellen stehen. Außerdem gibt es noch die autokrine Signalübermittlung. Da die bisherigen Ergebnisse die Hypothese einer bestehenden Kommunikation zwischen dem tubulären System und dem Glomerulus stützen, sollte herausgefunden werden, auf welchem Weg diese Kommunikation auf zellulärer Ebene ablaufen könnte. Auf die zuletzt erwähnte Signalvermittlung, die kontaktabhängige Signalübertragung über Zell-Zell-Kontakte, soll im Folgenden genauer eingegangen werden, da sie eine mögliche Erklärung für die tubulo-glomeruläre Kommunikation darstellt. Da Calcium als sekundärer Botenstoff eine große Rolle bei der Signaltransduktionskaskade spielt und eine Vielzahl von Prozessen in allen Zellen reguliert, sollte in der vorliegenden Arbeit eine calciumbasierte Zell-Zell-Kommunikation zwischen den proximalen Tubuluszellen untersucht werden. Dafür wurde das Mausmodell Pax8xGCamp5 generiert. Diese Mäuse exprimieren sowohl Tomato als auch das fluoreszierende Calcium Indikatorprotein GCamp5 in Tubuluszellen (Schiessl et al. 2018). Nachdem einzelne tubuläre Zellen fokussierter Laserstrahlung ausgesetzt waren, konnte in den benachbarten Tubuluszellen eine Farbumwandlung von Rot nach Grün beobachtet werden. Diese Grünfärbung zeigt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration an. Es scheint also, dass akute Zellschäden eine calciumbasierte Zellkommunikation zwischen einzelnen Tubuluszellen hervorrufen, welche die Grundlage für die Kommunikation zwischen dem Tubulussystem und dem Glomerulus darstellen könnte.

5.3 Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

Um die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zu klären, wurde diese durch Behandlung mit Hyaluronidase geschädigt. Dabei sollte überprüft werden, ob durch das „Shedding“ der endothelialen Glykokalyx die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beeinträchtigt wird. Der Siebkoeffizient für Albumin, der ein Maß für die Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere darstellt, nahm 20 Minuten nach Verabreichung der Hyaluronidase zu. Dies zeigt, dass nach Auflösung der endothelialen Glykokalyx die Durchlässigkeit des glomerulären Filters für Albumin ansteigt. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Albuminfiltration durch eine verstärkte Rückresorption im proximalen Tubulus kompensiert wird, wurde zunächst die Proteinausscheidung im Urin gemessen. Die Proteinausscheidung im Urin stieg 20 Minuten nach Schädigung der

endothelialen Glykokalyx an. Die Bestimmung der Gesamtproteinausscheidung im Urin gilt als ein unspezifisches diagnostisches Verfahren um festzustellen, ob eine Proteinurie vorliegt, da die Gesamtproteinausscheidung im Urin keinen Hinweis auf die Art der vorliegenden Proteinform gibt. Deshalb sollte geklärt werden, ob es sich bei der vorliegenden Proteinurie um eine Albuminurie handelt oder ob die gestiegene Proteinausscheidung im Urin durch andere Proteine bedingt wurde.

Des Weiteren legen Daten in der Literatur nahe, dass sogenannte major urinary proteins (mups) vor allem bei Nagetieren physiologischerweise im Urin aufzufinden sind und bei der Bestimmung der Gesamtproteinausscheidung eingeschlossen sind. Mups, auch als α_2 -Globuline bekannt, werden in der Leber synthetisiert und über den Urin ausgeschieden. Sie binden Pheromone und dienen der sozialen und sexuellen Interaktion der Nagetiere (Cavaggioni und Mucignat-Caretta 2000; Kress 2005). Um die Proteine im Urin genauer differenzieren zu können, wurden sie mit Hilfe der SDS-Page-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Mit Hilfe der SDS-Page-Gelelektrophorese und der Quantifizierung der Albuminkonzentration mittels ELISA konnte dargestellt werden, dass die Albuminkonzentration der Urinproben nach Verabreichung des Enzyms Hyaluronidase im Vergleich zu den basal gemessenen Werten anstieg. Diese Daten zeigen, dass die erhöhte Albuminfiltration nicht durch eine verstärkte Rückresorption im proximalen Tubulus kompensiert werden konnte.

Dies legt nahe, dass die endotheliale Glykokalyx eine essentielle Rolle in der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere spielt und eine Schädigung dieser Schicht die Permeabilität der Filtrationsbarriere für Albumin erhöht.

5.4 Korrelation zwischen einer klinisch manifesten Proteinurie und der Dichte der endothelialen Glykokalyx

Die aufgrund der bisherigen Ergebnisse aufgestellte Hypothese, dass eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx zu einer klinisch manifesten Proteinurie führt, wurde mit Hilfe von Munich Wistar Froemter Ratten überprüft. Laut Literaturangaben entwickeln männliche Tiere dieses Stammes mit zunehmendem Alter eine Proteinurie (Hackbarth et al. 1991; Remuzzi et al. 1988). Dies wurde überprüft, indem von männlichen MWF Ratten über den Zeitraum eines Jahres Urinproben gesammelt und der Protein-Osmolaritätsquotient bestimmt wurde. Dieser stieg mit fortschreitendem Lebensalter linear an und zeigt, dass sich diese Tiere für das pathologische Untersuchungsmodell der Proteinurie eignen.

Um die Hypothese zu prüfen, dass die Struktur und Funktion der endothelialen Glykokalyx für die Entwicklung einer Proteinurie mit zunehmendem Alter ursächlich ist, wurde die Dichte der endothelialen Glykokalyx über den Zeitraum eines Jahres gemessen und in Korrelation zu der Gesamtproteinausscheidung im Urin gesetzt. Mit abnehmender Dichte der endothelialen Glykokalyx nahm die Proteinausscheidung zu und belegte die Hypothese einer bestehenden Korrelation zwischen der Dichte der endothelialen Glykokalyx und der Proteinausscheidung im Urin. Eine Proteinurie ist unter anderem ein Symptom chronischer Nierenerkrankungen. Chronische Nierenerkrankungen wiederum gelten als Risikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, die eine hohe Mortalitätsrate aufweisen (Keith et al. 2004). Um das Risiko eines progressiven Verlaufs der chronischen Nierenerkrankung und vor allem des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen zu reduzieren, ist es wichtig, die Proteinurie frühzeitig zu erkennen und zu therapieren, um die Erhaltung der Nierenfunktion zu gewährleisten. Ein Hauptaugenmerk sollte hierbei auf die Protektion bzw. den Wiederaufbau der endothelialen Glykokalyx gelegt werden, da sie wie oben beschrieben eine essentielle Rolle bei der Entwicklung einer Proteinurie spielt.

5.5 Auswirkungen eines Hypertonus auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere

Der Hypertonus wird seit geraumer Zeit zu den wesentlichen Faktoren gezählt, die für das Fortschreiten einer Niereninsuffizienz verantwortlich sind (Tozawa et al. 2003). Eine arterielle Hypertonie kann ursächlich für eine Niereninsuffizienz sein ((Tozawa et al. 2003; Ridao et al. 2001; Klag et al. 1996). Außerdem wird sie auch als Begleiterscheinung von chronischen Nierenerkrankungen gesehen, die deren Progression beschleunigen kann (Ridao et al. 2001). Daten in der Literatur legen nahe, dass AngII sowohl den Blutdruck als auch den Siebkoeffizienten für Albumin erhöht (Schießl 2014). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Durchlässigkeit für Albumin und der Struktur der endothelialen Glykokalyx besteht. Des Weiteren sollte beurteilt werden, ob der Verlust der Integrität des glomerulären Filters ein hämodynamisches Phänomen ist, oder ob die erhöhte Albuminfiltration nach AngII-Infusion alleinig durch den AT1-Rezeptor vermittelt wird.

Um zu überprüfen, ob der proximale Tubulus die erhöhte Albuminfiltration nach AngII-Infusion durch eine verstärkte Rückresorption kompensieren kann, wurde die Protein- und Albuminausscheidung im Urin gemessen. Sowohl das Gesamtprotein im Urin als auch die Albuminausscheidung stiegen nach AngII-Infusion im Vergleich zu den Basalwerten an. Diese

Daten zeigen, dass die erhöhte Albuminfiltration nicht durch eine verstärkte Rückresorption im proximalen Tubulus kompensiert werden konnte und die Proteinurie nach einem durch AngII erhöhten Blutdruck durch Albumin bedingt ist.

Der Siebkoeffizient für Albumin stellt ein Maß für die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere dar. Deshalb stellte sich die Frage, inwieweit ein durch AngII erhöhter Blutdruck einen Effekt auf die endotheliale Glykokalyx, die erste Komponente des glomerulären Filters hat und, ob die erhöhte Durchlässigkeit für Albumin aus einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx resultiert. Nach akuter AngII-Infusion nahm die Dichte der endothelialen Glykokalyx ab. Die Änderungen der Dichte der endothelialen Glykokalyx korrelierten dabei nicht mit der Höhe des Blutdruckanstiegs. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die endotheliale Glykokalyx per se durch einen durch AngII erhöhten Blutdruck beeinflusst wird, eine weitere Erhöhung des Blutdrucks jedoch keine weiteren Veränderungen nach sich zieht. Des Weiteren verdeutlicht dies noch einmal die essentielle Rolle der endothelialen Glykokalyx für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere.

Um zu beurteilen, ob die Abnahme der Dichte der endothelialen Glykokalyx bei AngII-Infusion hämodynamische Ursachen hat, wurde der Blutdruck bei Tieren einer weiteren Versuchsgruppe durch Noradrenalin erhöht. In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen einer akuten Noradrenalin-Infusion auf die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere untersucht werden. Hierzu wurde zunächst der Siebkoeffizient für Albumin bestimmt. Nach einer 20-minütigen Noradrenalin-Infusion stieg der Siebkoeffizient für Albumin signifikant im Vergleich zu den basal gemessenen Werten an. Dies zeigt, dass sowohl nach einer Blutdruckerhöhung durch AngII als auch durch Noradrenalin die Filtrationsbarriere permeabler für Albumin wird. Sowohl die Gesamtproteinausscheidung als auch die Albuminausscheidung im Urin waren ebenfalls erhöht. Die erhöhte Albuminfiltration konnte also nicht durch eine verstärkte Rückresorption des proximalen Tubulus kompensiert werden. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx war nach Noradrenalin-Infusion, wie auch nach AngII-Infusion, erniedrigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl AngII als auch Noradrenalin die glomeruläre Filtrationsbarriere beeinflussen. Sowohl nach AngII- als auch nach Noradrenalin-Infusion stieg die Durchlässigkeit des glomerulären Filters für Albumin derart an, dass diese nicht durch eine verstärkte Rückresorption im proximalen Tubulus kompensiert werden konnte. Da beide vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen eine verringerte Dichte der endothelialen Glykokalyx zur Folge haben, ist davon auszugehen, dass die endotheliale Glykokalyx durch hämodynamische Prozesse beeinflusst wird. Dies legt nahe, dass der Verlust

der glomerulären Filtrationsbarriere unter anderem durch die verringerte Dichte der endothelialen Glykokalyx bedingt ist. Um diese klinisch relevanten Folgen eines erhöhten Blutdrucks auf die endotheliale Glykokalyx und damit die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zu verhindern, sollte ein Hypertonus entsprechend therapiert werden.

5.6 Beeinflussung der verschiedenen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx durch Hyaluronidase, Angiotensin II und Noradrenalin

Nach Injektion von Hyaluronidase, einer Substanz, die nachweislich die Struktur der endothelialen Glykokalyx schädigt, stieg der Siebkoeffizient für Albumin, der ein Maß für die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere ist, an. Dies verdeutlicht die essentielle Rolle der endothelialen Glykokalyx für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere. Auch nach AngII- und Noradrenalin-Infusion nahmen die Integrität des glomerulären Filters und die Dichte der endothelialen Glykokalyx ab. Um die Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Struktur der endothelialen Glykokalyx besser verstehen zu können, wurden die einzelnen Bestandteile der endothelialen Glykokalyx genauer analysiert. Es wurden drei verschiedene Bestandteile der endothelialen Glykokalyx untersucht: Syndekan1, Heparansulfat und Hyaluronidase. Syndekan1 ist als transmembranär verankertes Proteoglykan maßgeblich für die Bildung des Fundaments der endothelialen Glykokalyx verantwortlich. An dieses Fundament binden Glykosaminoglykane und bilden dadurch das Grundgerüst dieser Schicht (Pries et al. 2000). Heparansulfat stellt die Hauptfraktion der an die Proteoglykane angelagerten Glykosaminoglykane dar und wurde deshalb gezielt untersucht. Hyaluronsäure ist das einzige Glykosaminoglykan der endothelialen Glykokalyx, das nicht über ein Proteoglykan, sondern über den CD44 Rezeptor an der Zellmembran gebunden ist (Reitsma et al. 2007). So wurden drei Bestandteile der endothelialen Glykokalyx, die unterschiedlichen Einfluss auf deren Struktur haben, gemessen. Die Konzentration von Syndekan1 stieg sowohl im Urin als auch im Plasma nach Gabe von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur das die Glykokalyx schädigende Enzym Hyaluronidase, sondern auch die hämodynamisch wirkenden Substanzen Einfluss auf das Fundament der endothelialen Glykokalyx haben. Da die Konzentration von Syndekan1 im Urin und Plasma zunahm, wurde offensichtlich die Struktur der endothelialen Glykokalyx geschädigt und ihr Fundament abgetragen. Die Messergebnisse für Heparansulfat verhielten sich ähnlich. Auch hier kann man davon ausgehen, dass Heparansulfat aus dem Grundgerüst der endothelialen Glykokalyx abgetragen wurde. Sowohl die Urin- als auch die Plasmakonzentration der Hyaluronsäure änderten sich nach AngII-Infusion nicht. AngII hat also keinen messbaren

Einfluss auf die Hyaluronsäure in der Struktur der endothelialen Glykokalyx. Die Konzentration von Hyaluronsäure sank sowohl im Urin als auch im Plasma signifikant nach Zugabe der Hyaluronidase und Noradrenalin-Infusion. Hier stellte sich die Frage, wo die Hyaluronsäure verblieben ist, wenn die Konzentration im Vergleich zu den basalen Werten gesunken ist. Die Hypothese, dass bei einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx eine vermehrte Anlagerung der Hyaluronsäure an die Endothelzellen erfolgt, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Gouverneur et al. 2006). Versuche an isolierten Femoralarterien zeigten, dass nach Gabe der Hyaluronidase die fluss-induzierte Produktion von NO abgeschwächt war. Diese reduzierte Fähigkeit des vaskulären Endothels zu Umwandlung von biomechanischen Kräften in biochemische Signale zeigt, dass Hyaluronsäure eine große Rolle in der Mechanotransduktion der Endothelzellen spielt (Mochizuki et al. 2003). In vivo Experimente zeigten, dass nach einer Erhöhung des Hyaluronsäure-Plasmaspiegels das Eindringen von Dextran in die endotheliale Glykokalyx erhöht war (Henry und Duling 1999). Ein Verlust der Hyaluronsäure zog einen erhöhten transkapillären Fluss und eine Permeabilitäts-erhöhung für Plasmaproteine nach sich (van den Berg et al. 2003). Dies zeigt, dass die Verbindung der Hyaluronsäure mit endothelialen Proteoglykanen essentiell für die Permeabilität der Barrierefunktion ist. Im Jahr 2006 veröffentlichten Vink und sein Team eine Studie, in der nachgewiesen wurde, dass „Shear Stress“ die Inkorporation und auch die Synthese der Hyaluronsäure stimuliert. Sie vermuten, dass Hyaluronsäure in der endothelialen Glykokalyx zu einer optimalen Funktion des Endothels beiträgt und dieses schützt (Gouverneur et al. 2006). Eine mögliche Erklärung für die gemessenen Ergebnisse ist, dass das abgetragene Grundgerüst der endothelialen Glykokalyx für die Endothelzellen ein Stimulus ist, Hyaluronsäure sowohl über das „Hyaluronic acid binding protein“ zu binden als auch Hyaluronsäure zu synthetisieren, um das Endothel zu schützen und dessen Funktionsfähigkeit zu bewahren. Diese Vermutung ist in Abbildung 39 schematisch veranschaulicht.

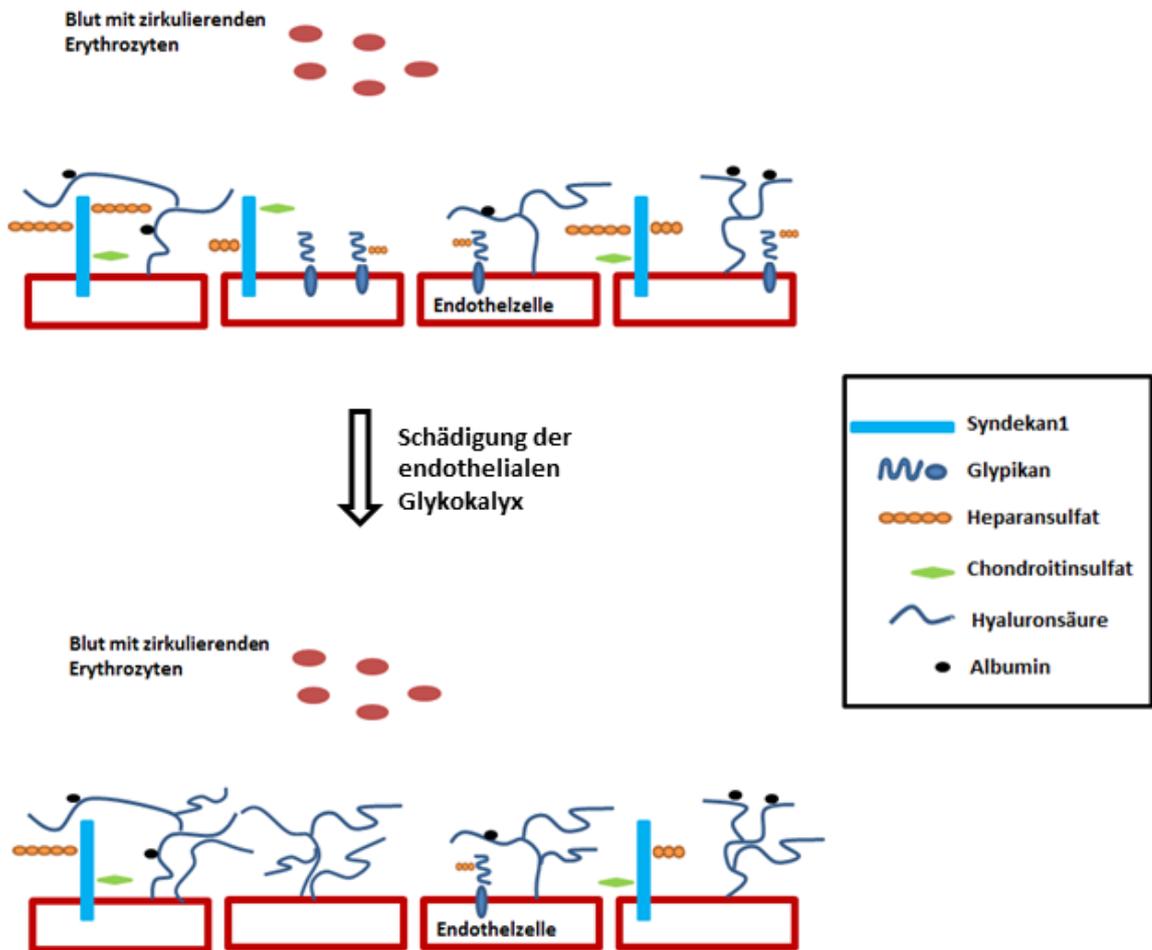


Abbildung 39: Mögliche strukturelle Änderung der endothelialen Glykokalyx nach ihrer Schädigung: Durch das Abtragen des Grundgerüsts der endothelialen Glykokalyx werden die Endothelzellen stimuliert mehr Hyaluronsäure zu binden, um das Endothel zu schützen.

5.7 Untersuchung der endothelialen Glykokalyx in vitro

Die Experimente haben gezeigt, dass eine akute Schädigung proximaler Tubuluszellen eine erhöhte Albuminfiltration über die glomeruläre Filtrationsbarriere zur Folge hat. Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine Kommunikation zwischen dem tubulären System und dem glomerulären Filter vorliegt, die die Permeabilität der Filtrationsbarriere beeinflussen kann. Wie bereits beschrieben, wäre eine stromabwärts vermittelte Kommunikation über die osmosensorischen Macula-densa Zellen vorstellbar, die über einen Feedbackmechanismus die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflussen könnten. Macula-densa Zellen sind Teil des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Sie sind Zellen des geraden Teils des distalen Tubulus und liegen dem Vas afferens des zugehörigen Glomerulum unmittelbar an. Der tubuloglomeruläre Feedback, der die Filtration einzelner Nephrone der Niere reguliert, basiert auf

der osmosensorischen Eigenschaft der Macula-densa Zellen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, dass Macula-densa Zellen möglicherweise Substanzen aus dem abgeschilferten Material, das durch eine akute Zellschädigung im proximalen Tubulus entsteht, detektieren und anschließend selbst Substanzen freisetzen, die die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflussen. Da noch keine Substanzen näher definiert wurden, die durch eine laserinduzierte Schädigung von proximalen Tubuluszellen freigesetzt werden, wurde der Fokus zunächst auf den zweiten Teil der Hypothese gelegt und mögliche Substanzen gesucht, die eine tubulo-glomeruläre Kommunikation vermitteln und die Filtrationsbarriere beeinflussen können. Da die Macula-densa Zellen keine morphologische Kopplung an Muskelzellen oder Mesangialzellen aufweisen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Distanz zwischen den Macula-densa Zellen und der glomerulären Filtrationsbarriere durch parakrine Faktoren überbrückt werden muss (Schnermann und Castrop 2006). Sowohl ATP als auch NO werden im juxtaglomerulären Apparat synthetisiert und besitzen vasoaktive Eigenschaften. Adenosin entsteht durch Dephosphorylierung des ATPs. Diese drei Substanzen werden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Da der Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere nach Schädigung von proximalen Tubuluszellen mit einem Verlust der Dichte der endothelialen Glykokalyx einherging, sollten zunächst ihre direkten Auswirkungen auf die endotheliale Glykokalyx untersucht werden. Die drei Substanzen wurden den kultivierten Endothelzellen hinzugefügt. Als Stickstoffmonooxid-Donor wurde Natriumnitroprussid (SNP) verwendet. Anschließend wurde die Dichte der endothelialen Glykokalyx vermessen und mit den Daten der Negativkontrolle verglichen. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx stieg sowohl nach einer Inkubation mit ATP als auch nach Adenosin-Inkubation signifikant an. Nach Zugabe von SNP blieb die Dichte der endothelialen Glykokalyx der kultivierten Zellen dagegen unverändert. Zwischen einer einstündigen und einer 16-stündigen Inkubationszeit war kein Unterschied messbar. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die endotheliale Glykokalyx sowohl durch ATP also auch durch Adenosin beeinflussbar ist und nach deren Einwirkung eine gesteigerte Dichte aufweist. Da nach einer akuten Schädigung der proximalen Tubuluszellen die Dichte der endothelialen Glykokalyx signifikant abnahm, spielen für die durch eine tubulo-glomeruläre Kommunikation vermittelte Änderung der endothelialen Glykokalyx wahrscheinlich andere Faktoren als ATP und Adenosin eine Rolle, da diese eine Zunahme der Dichte der endothelialen Glykokalyx zur Folge hatten.

6 Zusammenfassung

Ein Kennzeichen vieler Nierenerkrankungen unterschiedlichen Ursprungs ist die Albuminurie. Zu einer pathologisch erhöhten Eiweißausscheidung im Urin kann es zum einen durch einen Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere und zum anderen durch eine reduzierte Fähigkeit des proximalen Tubulus zur Reabsorption kommen. Ein klinisch relevantes Beispiel für eine reduzierte tubuläre Reabsorptionsfähigkeit ist die akute Tubulusnekrose. Typische Symptome der akuten Tubulusnekrose sind Albuminurie und eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate. Diese Abnahme der glomerulären Filtrationsrate legt nahe, dass Schäden im tubulären System die Funktion der Filtrationsbarriere modulieren. Deshalb sollte die vorliegende Arbeit die Hypothese klären, dass Schäden im tubulären System zu einer erhöhten Albuminfiltration führen. Mit Hilfe der intravitalen Multiphotonenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass 20 Minuten nach Ablation einzelner Tubulusepithelzellen der Siebkoeffizient für Albumin anstieg. Somit führen Schädigungen des tubulären Systems zu einer erhöhten Albuminfiltration, die durch eine tubulo-glomeruläre Kommunikation vermittelt wird. Da einem erhöhten Siebkoeffizienten für Plasmaproteine unter anderem der Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zugrunde liegt, wurde als Nächstes die endotheliale Glykokalyx, die erste Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere, untersucht. Die Dichte der endothelialen Glykokalyx nahm nach einer laserinduzierten akuten Tubulusnekrose ab.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, sowohl die Mechanismen einer tubulo-glomerulären Kommunikation als auch die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die glomeruläre Filtrationsbarriere zu klären.

Um zunächst die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die glomeruläre Filtrationsbarriere zu klären, wurde diese durch Gabe von Hyaluronidase geschädigt. Nach Enzymgabe stieg der Siebkoeffizient für Albumin an. Dieser Befund zeigt deutlich den Einfluss der endothelialen Glykokalyx auf den Siebkoeffizienten für Albumin.

Die aufgrund der bisherigen Ergebnisse aufgestellte Hypothese, dass eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx zu einer klinisch manifesten Proteinurie führt, wurde mit Hilfe von Munich Wistar Froemter Ratten überprüft. Tiere dieses Stammes werden mit zunehmendem Alter proteinurisch. Mit fortschreitendem Alter der Tiere konnte ein Verlust der Dichte der endothelialen Glykokalyx sowie eine erhöhte Proteinausscheidung im Urin nachgewiesen werden, was die Hypothese einer Korrelation zwischen der Dichte der endothelialen Glykokalyx und der Proteinausscheidung im Urin bestätigt.

Angiotensin II ist ein klassisches pro-proteinurisches Agens.

Deshalb sollte geklärt werden, ob AngII einen Effekt auf die endotheliale Glykokalyx hat und dadurch zu einer erhöhten glomerulären Filtration von Albumin führt. Nach AngII-Infusion nahm die Dichte der endothelialen Glykokalyx ab, während die Albuminausscheidung im Urin anstieg.

Um zu beurteilen, ob der Abfall der Dichte der endotheliale Glykokalyx bei AngII-Infusion eine hämodynamische Ursache hat, wurde der Blutdruck analog bei Tieren einer weiteren Versuchsgruppe durch Noradrenalin erhöht. Der Siebkoeffizient für Albumin stieg nach Noradrenalin-Infusion an und auch die Albuminausscheidung im Urin war erhöht. Ähnlich wie nach einer AngII-Infusion war die Dichte der endotheliale Glykokalyx auch nach Noradrenalin-Infusion erniedrigt. Daher ist davon auszugehen, dass die endotheliale Glykokalyx durch hämodynamische Prozesse beeinflusst wird.

Diese Daten sprechen für eine kardinale Bedeutung der glomerulären Glykokalyx für die funktionelle Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere.

7 Summary

Title: The endothelial glycocalyx as an essential component of the glomerular filtration barrier: An intravital multiphoton microscopy study

Albuminuria is a hallmark of kidney disease of various etiologies. Acute lesions of the renal tubular system (acute tubular necrosis) are frequently accompanied by albuminuria, which is considered to be the consequence of a compromised tubular reabsorptive function. Net urinary albumin excretion, however, is determined by glomerular albumin filtration and subsequent tubular reabsorption. The hypothesis was that a tubular-glomerular crosstalk may lead to an increased filtration of albumin in situations of insults to the tubular system, and, consequently contribute to the development of albuminuria. Intravital multiphoton microscopy was used to determine the glomerular sieving coefficient (GSC) of albumin after the loss of single cells of the proximal tubule in an otherwise healthy kidney. Single tubular cells were ablated by focused laser exposure to imitate acute tubular necrosis. Within 20 minutes after laser ablation of a few proximal tubular cells, the GSC of albumin of the affected nephron increased rapidly, whereas the GSC of albumin of neighboring nephrons remained unchanged. In parallel to the albumin leakiness of the glomeruli of the affected nephrons, the density of the glomerular endothelial glycocalyx declined after tubular lesions.

The aim of this work was to address the mechanism of this tubulo-glomerular communication and to determine the role of the endothelial glycocalyx in the function of the glomerular filtration barrier.

For this purpose, the endothelial glycocalyx was damaged by the administration of hyaluronidase. After injecting the enzyme, the GSC of albumin increased, which shows the relevancy of the endothelial glycocalyx for the glomerular sieving coefficient. To test the hypothesis that a damaged endothelial glycocalyx is linked to a clinically manifest proteinuria, Munich Wistar Froemter rats were used. Animals of this strain are known to become proteinuric with increasing age. With advancing age of the animals, the density of the glomerular endothelial glycocalyx declined and the urinary protein excretion increased, which confirmed the hypothesis of a correlation between the density of the endothelial glycocalyx and the urinary protein excretion. In a control group of Wistar rats, which do not become proteinuric with increasing age, no changes of the endothelial glycocalyx were detected.

Hypertension leads to changes of the glomerular filtration barrier and is frequently linked with albuminuria. The literature suggests that AngII raises the blood pressure as well as the sieving coefficient of albumin. Therefore, the aim of the present thesis was to determine the effects of

Summary

AngII on the endothelial glycocalyx. After AngII-infusion, the density of the endothelial glycocalyx decreased, while the albumin concentration in the urine increased. Changes of the density of the endothelial glycocalyx did not correlate with blood pressure increases. In order to address whether the decline of the density of the endothelial glycocalyx during AngII was caused by hemodynamic effects, an additional group of animals was infused with noradrenalin. Similarly to what was observed after AngII-infusion the density of the endothelial glycocalyx declined after noradrenalin-infusion, suggesting that hemodynamic effects compromised the integrity of the endothelial glycocalyx.

In summary, clinically relevant events, such as acute tubular necrosis and hypertension affect the filtration of albumin by modifying the endothelial glycocalyx, suggesting that the endothelial glycocalyx is crucial for the maintenance of the integrity of the glomerular filtration barrier.

8 Literaturverzeichnis

- Adamson, R. H.; Lenz, J. F.; Zhang, X.; Adamson, G. N.; Weinbaum, S.; Curry, F. E. (2004): Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. In: *The Journal of Physiology* 557 (Pt 3), S. 889–907.
- Anunay, S. (2006): Dynamic stokes shift and excitation wavelength dependent fluorescence of dipolar molecules in room temperature ionic liquids. In: *The journal of physical chemistry. B* 110 (28), S. 13704–13716.
- Arif, E.; Nihalani, D. (2013): Glomerular Filtration Barrier Assembly: An insight. In: *Postdoc journal : a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs* 1 (4), S. 33–45.
- Arnold, W. (2015): Physiologie der Haustiere. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Hg. v. von Engelhardt W., Breves G., Diener M. und Gäbel G.. Stuttgart: Enke Verlag.
- Barker, A. L.; Konopatskaya, O.; Neal, C. R.; Macpherson, J. V.; Whatmore, J. L.; Winlove, C. P. et al. (2004a): Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (5), S. 1006–1011.
- Becker, B. F.; Chappell, D.; Bruegger, D.; Annecke, T.; Jacob, M. (2010): Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. In: *Cardiovascular Research* 87 (2), S. 300–310.
- Beltina.org: Aufbau des Nephrons. Online verfügbar unter <https://www.beltina.org/nephron-function-and-definition/>.
- Bouchard, M.; Souabni, A.; Busslinger, M. (2004): Tissue-specific expression of cre recombinase from the Pax8 locus. In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 38 (3), S. 105–109. .
- Brown, C. P.; Houle, M.; Popov, K.; Nicklaus, M.; Couture, C.; Laliberté, M. et al. (2013): Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale. In: *Biomedical optics express* 5 (1), S. 233–243.
- Bruegger, D.; Jacob, M.; Rehm, M.; Loetsch, M.; Welsch, U.; Conzen, P.; Becker, B. (2005): Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289 (5), H1993-9.
- Buselmaier, W. (Hg.) (2009): Biologie für Mediziner. Mit Glossar. 11., völlig Neubearb. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin (Springer E-book Collection).
- Carey, D. J. (1997): Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. In: *Biochemical Journal* 327 (Pt 1), S. 1–16.
- Castrop, H. (2016): Tubuloglomeruläres Feedback. In: *Nephrologie* 11 (2), S. 150–152.
- Castrop, H.; Schießl, I. M. (2017): Novel routes of albumin passage across the glomerular filtration barrier. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 219 (3), S. 544–553.
- Cavaggioni, A.; Mucignat-Caretta, C. (2000): Major urinary proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin. In: *Biochimica et biophysica acta* 1482 (1-2), S. 218–228.

- Chambers, R.; Zweifach, B. W. (1947): Intercellular cement and capillary permeability. In: *Physiological reviews* 27 (3), S. 436–463.
- Chappell, D.; Hofmann-Kiefer, K.; Jacob, M.; Rehm, M.; Briegel, J.; Welsch, U. et al. (2009a): TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. In: *Basic research in cardiology* 104 (1), S. 78–89.
- Chappell, D.; Jacob, M.; Hofmann-Kiefer, K.; Bruegger, D.; Rehm, M.; Conzen, P. et al. (2007): Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. In: *Anesthesiology* 107 (5), S. 776–784.
- Chappell, D.; Jacob, M.; Hofmann-Kiefer, K.; Rehm, M.; Welsch, U.; Conzen, P.; Becker, BF. (2009b): Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. In: *Cardiovascular Research* 83 (2), S. 388–396.
- Constantinescu, A. A.; Vink, H.; Spaan, J. A. E. (2003): Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (9), S. 1541–1547.
- Currie, G.; Delles, C. (2013): Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. In: *International journal of nephrology and renovascular disease* 7, S. 13–24.
- Danielli, J. F. (1940): Capillary permeability and oedema in the perfused frog. In: *The Journal of Physiology* 98 (1), S. 109–129.
- Davies, P. F. (1995): Flow-mediated endothelial mechanotransduction. In: *Physiological reviews* 75 (3), S. 519–560.
- Deen, W. M. (2004): What determines glomerular capillary permeability? In: *The Journal of clinical investigation* 114 (10), S. 1412–1414.
- Deetjen, P.; Alzheimer, C. (Hg.) (2005): Physiologie. Mit 88 Tabellen ; 4., vollst. überarb. Aufl., [Nachdr.]. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Dewey, C. F.; Bussolari, S. R.; Gimbrone, M. A.; Davies, P. F. (1981): The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. In: *Journal of biomechanical engineering* 103 (3), S. 177–185.
- Dickson, L. E.; Wagner, M. C.; Sandoval, R. M.; Molitoris, B. A. (2014): The proximal tubule and albuminuria: really! In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25 (3), S. 443–453.
- Dunn, K. W.; Sandoval, R. M.; Kelly, K. J.; Dagher, P. C.; Tanner, G. A.; Atkinson, S. J. et al. (2002): Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 283 (3), C905-16.
- Florian, J. A.; Kosky, J. R.; Ainslie, K.; Pang, Z.; Dull, R. O.; Tarbell, J. M. (2003): Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. In: *Circulation research* 93 (10), e136-42.
- Gee, J. M.; Smith, N. A.; Fernandez, F. R.; Economo, M. N.; Brunert, D.; Rothermel, M. et al. (2014): Imaging activity in neurons and glia with a Polr2a-based and cre-dependent GCaMP5G-IRES-tdTomato reporter mouse. In: *Neuron* 83 (5), S. 1058–1072.
- Göppert-Mayer, M. (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. In: *Ann. Phys.* 401 (3), S. 273–294.

Gouverneur, M.; Spaan, J. A. E.; Pannekoek, H.; Fontijn, R. D.; Vink, H. (2006): Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 290 (1), H458-2.

Greka, A.; Mundel, P. (2012): Cell biology and pathology of podocytes. In: *Annual review of physiology* 74, S. 299–323.

Greten, H.; Rinninger, F.; Greten, T. F.; Amling, M. (Hg.) (2010): Innere Medizin. 395 Tabellen. 13., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Hackbarth, H.; Büttner, D.; Jarck, D.; Pothmann, M.; Messow, C.; Gärtner, K. (1983): Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Frömter (MWF) rats. In: *Renal physiology* 6 (2), S. 63–71.

Hackbarth, H.; Gwinner, W.; Alt, J. M.; Hagemann, I.; Thiemann, A.; Finke, B. (1991): The Munich Wistar Frömter rat: proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli. In: *Renal physiology and biochemistry* 14 (6), S. 246–252.

Hanif, M. O.; Ramphul, K. (2018): Renal Tubular Necrosis, Acute: StatPearls Publishing.

Haraldsson, B.; Nyström, J.; Deen, W. M. (2008): Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. In: *Physiological reviews* 88 (2), S. 451–487.

Henry, C. B.; Duling, B. R. (1999): Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. In: *The American journal of physiology* 277 (2), H508-14.

Henry, C. B.; Duling, B. R. (2000): TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279 (6), H2815-23.

Hwang, S.; Park, J.; Kim, J.; Jang, H. R.; Kwon, G. Y.; Huh, W. et al. (2017): Tissue expression of tubular injury markers is associated with renal function decline in diabetic nephropathy. In: *Journal of diabetes and its complications* 31 (12), S. 1704–1709. .

Jacob, M.; Bruegger, D.; Rehm, M.; Welsch, U.; Conzen, P.; Becker, B. F. (2006): Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. In: *Anesthesiology* 104 (6), S. 1223–1231.

Jacob, M.; Chappell, D. (2013): Reappraising Starling: the physiology of the microcirculation. In: *Current opinion in critical care* 19 (4), S. 282–289.

Jacob, M.; Paul, O.; Mehringer, L.; Chappell, D.; Rehm, M.; Welsch, U. et al. (2009): Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia. In: *Transplantation* 87 (7), S. 956–965.

Jarad, G.; Miner, J. H. (2009): Update on the glomerular filtration barrier. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 18 (3), S. 226–232.

Jeansson, M.; Haraldsson, B. (2006): Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 290 (1), F111-6.

Jensen, J. S.; Feldt-Rasmussen, B.; Strandgaard, S.; Schroll, M.; Borch-Johnsen, K. (2000): Arterial hypertension, microalbuminuria, and risk of ischemic heart disease. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 35 (4), S. 898–903.

- Johansson, P.; Bergström, A.; Achmann-Andersen, N. J.; Meyer, M. A. S.; Ostrowski, S. R.; Nordsborg, N. B.; Olsen, N. V. (2014): Effect of acute hypobaric hypoxia on the endothelial glycocalyx and digital reactive hyperemia in humans. In: *Frontiers in physiology* 5, S. 459.
- Kawakami, H.; Murakami, T.; Kajii, T. (1990): Normal values for 24-h urinary protein excretion: total and low molecular weight proteins with a sex-related difference. In: *Clinical nephrology* 33 (5), S. 232–236.
- Keith, D. S.; Nichols, G. A.; Gullion, C. M.; Brown, J. B.; Smith, D. H. (2004): Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. In: *Archives of internal medicine* 164 (6), S. 659–663.
- Klag, M. J.; Whelton, P. K.; Randall, B. L.; Neaton, J. D.; Brancati, F. L.; Ford, C. E. et al. (1996): Blood pressure and end-stage renal disease in men. In: *The New England journal of medicine* 334 (1), S. 13–18.
- Klinke, R.; Pape, H.; Silbernagl, Stefan (Hg.) (2005): Physiologie. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Kress D. C. (2005): Etablierung und Charakterisierung eines Wachstumshormon-transgenen Mausmodells auf Inzuchtbasis (FVB/N).
- Lee, M.; Saver, J. L.; Chang, K.; Liao, H.; Chang, S.; Ovbiagele, B. (2010): Impact of microalbuminuria on incident stroke: a meta-analysis. In: *Stroke* 41 (11), S. 2625–2631.
- Levick, J. R. (1991): Capillary filtration-absorption balance reconsidered in light of dynamic extravascular factors. In: *Experimental physiology* 76 (6), S. 825–857.
- Lijnen, H. R.; Collen, D. (1997): Endothelium in hemostasis and thrombosis. In: *Progress in cardiovascular diseases* 39 (4), S. 343–350.
- Luft, J. H. (1966): Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. In: *Federation proceedings* 25 (6), S. 1773–1783.
- Marcum, J. A.; Rosenberg, R. D. (1987): Anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan and the vascular endothelium. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 13 (4), S. 464–474.
- McCullough, P. A.; Shaw, A. D.; Haase, M.; Bouchard, J.; Waikar, S. S.; Siew, E. D. et al. (2013): Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. In: *Contributions to nephrology* 182, S. 13–29.
- Megens, R. T. A.; Reitsma, S.; Schiffers, P. H. M.; Hilgers, R. H. P.; Mey, J. G. R. de; Slaaf, D. W. et al. (2007): Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. In: *Journal of vascular research* 44 (2), S. 87–98.
- Menon, M. C.; Chuang, P. Y.; He, C. John (2012): The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. In: *International journal of nephrology* 2012, S. 749010.
- Mertens, G.; Cassiman, J. J.; van den Berghe, H.; Vermylen, J.; David, G. (1992): Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (28), S. 20435–20443.

- Miner, J. H. (2012): The Glomerular Basement Membrane. In: *Experimental Cell Research* 318 (9), S. 973–978.
- Miranda, C. H.; Carvalho Borges, M.; Schmidt, A.; Marin-Neto, J.; Pazin-Filho, A. (2016): Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome. In: *Atherosclerosis* 247, S. 184–188.
- Mochizuki, S.; Vink, H.; Hiramatsu, O.; Kajita, T.; Shigeto, F.; Spaan, J. A. E.; Kajiya, F. (2003): Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285 (2), H722-6.
- Nelson, A.; Berkestedt, I.; Schmidtchen, A.; Ljunggren, L.; Bodelsson, M. (2008): Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 30 (6), S. 623–627.
- Nielsen, J. S.; McNagny, K. M. (2009): The role of podocalyxin in health and disease. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20 (8), S. 1669–1676.
- Nieuwdorp, M.; Meuwese, M. C.; Mooij, H. L.; Ince, C.; Broekhuizen, L. N.; Kastelein, J. J. P. et al. (2008): Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 104 (3), S. 845–852.
- Nieuwdorp, Max; Meuwese, Marijn C.; Vink, Hans; Hoekstra, Joost B. L.; Kastelein, J. J. P.; Stroes, E. S. G. (2005): The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. In: *Current opinion in lipidology* 16 (5), S. 507–511.
- Nieuwdorp, M.; van Haeften, T. W.; Gouverneur, M. C. L. G.; Mooij, H. L.; van Lieshout, M. H. P.; Levi, M. et al. (2006): Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. In: *Diabetes* 55 (2), S. 480–486.
- Oheim, M; Michael, D. J.; Geisbauer, M.; Madsen, D.; Chow, R. H. (2006): Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (7), S. 788–808.
- Pape, H.; Kurtz, A.; Silbernagl, Stefan (2018): Physiologie. 8., unveränderte Auflag. Stuttgart: Thieme.
- Parker, K. A.; Tollefsen, D. M. (1985): The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3501–3505.
- Pavenstädt, H.; Kriz, W.; Kretzler, M. (2003): Cell biology of the glomerular podocyte. In: *Physiological reviews* 83 (1), S. 253–307.
- Peti-Peterdi, J.; Harris, R. C. (2010): Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (7), S. 1093–1096.
- Potter, D. R.; Jiang, J.; Damiano, E. R. (2009): The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. In: *Circulation research* 104 (11), S. 1318–1325..
- Pries, A. R.; Secomb, T. W.; Gaehtgens, P. (2000): The endothelial surface layer. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 440 (5), S. 653–666.
- Rehm, M.; Zahler, S.; Lötsch, M.; Welsch, U.; Conzen, P.; Jacob, M.; Becker, Bernhard F. (2004): Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl

starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. In: *Anesthesiology* 100 (5), S. 1211–1223.

Reitsma, S.; Slaaf, D. W.; Vink, H.; van Zandvoort, M. A. M. J.; oude Egbrink, Mirjam G. A. (2007): The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454 (3), S. 345–359.

Remuzzi, A.; Puntorieri, S.; Mazzoleni, A.; Remuzzi, G. (1988): Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. In: *Kidney international* 34 (4), S. 481–486.

Remuzzi, G.; Bertani, T. (1998): Pathophysiology of progressive nephropathies. In: *The New England journal of medicine* 339 (20), S. 1448–1456.

Ridao, N.; Luño, J.; García de Vinuesa, S.; Gómez, F.; Tejedor, A.; Valderrábano, F. (2001): Prevalence of hypertension in renal disease. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16 Suppl 1, S. 70–73.

Rubanyi, G. M.; Romero, J. C.; Vanhoutte, P. M. (1986): Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. In: *The American journal of physiology* 250 (6 Pt 2), H1145-9.

Salmon, A. H. J.; Ferguson, J. K.; Burford, J. L.; Gevorgyan, H.; Nakano, D.; Harper, S. J. et al. (2012): Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23 (8), S. 1339–1350.

Sarnak, M. J.; Levey, A.S.; Schoolwerth, A. C.; Coresh, J.; Culeton, B.; Hamm, L. L. et al. (2003): Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. In: *Circulation* 108 (17), S. 2154–2169.

Schießl, I. M. (2014): Chronische und akute Effekte von Angiotensin II auf die glomeruläre Filtration und die podozytäre Endozytose von Albumin.

Schießl, I. M.; Bardehle, Sophia; Castrop, Hayo (2013): Superficial nephrons in BALB/c and C57BL/6 mice facilitate in vivo multiphoton microscopy of the kidney. In: *PLoS one* 8 (1), e52499.

Schießl, I.M.; Grill, A.; Fremter, K.; Steppan, D.; Hellmuth, M.; Castrop, H. (2018): Renal Interstitial Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Cells Support Proximal Tubular Regeneration. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 29 (5), S. 1383–1396.

Schnermann, J.; Castrop, H. (2006): Regulation vasomotorischer und sekretorischer Aktivität im juxtaglomerulären Apparat der Niere durch parakrine Faktoren. In: Klaus Ruckpaul und Detlev Ganten (Hg.): *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. 1. Aufl. s.l.: Springer-Verlag (Molekulare Medizin), S. 353–375.

Schütz, N. (2000): Diagnostik und Verlaufsbeobachtung der Proteinurie nierentransplantierte Patienten mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Vergleich der nephrotoxischen Einflüsse der Immunsuppression.

Shepard, B. D.; Pluznick, J. L. (2016): How does your kidney smell? Emerging roles for olfactory receptors in renal function. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 31 (5), S. 715–723.

- Siddall, E.C.; Radhakrishnan, J. (2012): The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. In: *Kidney international* 82 (6), S. 635–642.
- Singh, A.; Satchell, S. C.; Neal, C. R.; McKenzie, E. A.; Tooke, J. E.; Mathieson, P. W. (2007): Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18 (11), S. 2885–2893.
- Starling, E. H. (1896): On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. In: *The Journal of Physiology* 19 (4), S. 312–326.
- Stehouwer, C. D. A.; Smulders, Y. M. (2006): Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17 (8), S. 2106–2111.
- Toblli, J. E.; Bevione, P.; Di Gennaro, F.; Madalena, L.; Cao, G.; Angerosa, M. (2012): Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications. In: *International journal of nephrology* 2012, S. 546039.
- Tovar, A. M. F.; Mattos, Di. A. de; Stelling, M. P.; Sarcinelli-Luz, B. S. L.; Nazareth, R. A.; Mourão, P. A. S. (2005): Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. In: *Biochimica et biophysica acta* 1740 (1), S. 45–53.
- Tozawa, M.; Iseki, K.; Iseki, C.; Kinjo, K.; Ikemiya, Y.; Takishita, S. (2003): Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 41 (6), S. 1341–1345.
- van den Berg, B.M.; Vink, H.; Spaan, J. A. E. (2003): The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. In: *Circulation research* 92 (6), S. 592–594.
- van Haaren, P. M. A.; VanBavel, E.; Vink, H.; Spaan, J. A. E. (2003): Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285 (6), H2848-56.
- van Haaren, P. M. A.; VanBavel, E.; Vink, H.; Spaan, J. A. E. (2005): Charge modification of the endothelial surface layer modulates the permeability barrier of isolated rat mesenteric small arteries. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289 (6), H2503-7.
- Vink, H.; Constantinescu, A. A.; Spaan, J. A. (2000): Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. In: *Circulation* 101 (13), S. 1500–1502.
- Vink, H.; Duling, B. R. (1996): Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. In: *Circulation research* 79 (3), S. 581–589.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx	8
Abbildung 3: Darstellung der Messregionen für den Siebkoeffizienten für Albumin	24
Abbildung 4: Filtration von LY zur Messung der snGFR	25
Abbildung 5: Darstellung der endothelialen Glykokalyx mittels wheat germ agglutinin mit Hilfe der intravitalen Multiphotonenmikroskopie	26
Abbildung 6: Darstellung der endothelialen Glykokalyx mittels wheat germ agglutinin mit Hilfe der Multiphotonenmikroskopie	28
Abbildung 7: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin	33
Abbildung 8: Nephronspezifischer Anstieg des Siebkoeffizienten für Albumin	34
Abbildung 9: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die snGFR	35
Abbildung 10: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf den Querschnitt des proximalen Tubulus	36
Abbildung 11: Auswirkungen einer akuten Tubulusnekrose auf die Dichte der endothelialen Glykokalyx	37
Abbildung 12: Zell-Zell-Kommunikation	38
Abbildung 13: Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin	39
Abbildung 14: Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Proteinausscheidung im Urin	40
Abbildung 15: Proteindifferenzierung mittels eines Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Page Gels nach Hyaluronidase-Applikation	41
Abbildung 16: Auswirkungen des Enzyms Hyaluronidase auf die Albuminausscheidung im Urin	42
Abbildung 17: Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin von heranwachsenden MWF Ratten	43
Abbildung 18: Dichte der endothelialen Glykokalyx in heranwachsenden MWF Ratten über den Zeitraum eines Jahres	44
Abbildung 19: Korrelation zwischen der Dichte der endothelialen Glykokalyx und der Proteinausscheidung im Urin	45
	88

Abbildung 20: Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin von heranwachsenden Wistar Ratten	45
Abbildung 21: Dichte der endothelialen Glykokalyx in heranwachsenden Wistar Ratten über den Zeitraum eines Jahres	46
Abbildung 22: Auswirkungen von Angiotensin II auf die Proteinausscheidung im Urin	47
Abbildung 23: Proteindifferenzierung mittels eines Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Page Gels nach AngII-Infusion	48
Abbildung 24: Auswirkungen von Angiotensin II auf die Albuminausscheidung im Urin	49
Abbildung 25: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach Erhöhung des Blutdrucks durch AngII-Infusion	50
Abbildung 26: Auswirkungen einer Blutdruckerhöhung durch Noradrenalin-Infusion auf den glomerulären Siebkoeffizienten für Albumin	51
Abbildung 27: Auswirkungen einer Blutdruckerhöhung durch Noradrenalin auf die Proteinausscheidung im Urin	52
Abbildung 28: Proteindifferenzierung mittels eines Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten SDS-Page Gels nach Noradrenalin-Infusion	53
Abbildung 29: Auswirkungen von Noradrenalin auf die Albuminausscheidung im Urin	54
Abbildung 30: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach Erhöhung des Blutdrucks durch Noradrenalin-Infusion	55
Abbildung 31: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Syndekan1-Konzentration im Urin	57
Abbildung 32: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Syndekan1-Konzentration im Plasma	58
Abbildung 33: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Heparansulfat-Konzentration im Urin	59
Abbildung 34: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Hyaluronsäure-Konzentration im Urin	60
Abbildung 35: Auswirkungen von Hyaluronidase, AngII und Noradrenalin auf die Hyaluronsäure-Konzentration im Plasma	61
Abbildung 36: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach einstündiger Inkubation der kultivierten Endothelzellen mit ATP, Adenosin und SNP	63
Abbildung 37: Dichte der endothelialen Glykokalyx nach 16-stündiger Inkubation mit ATP, Adenosin und SNP	64
Abbildung 38: Mögliche Erklärung für einen Anstieg des Lumens des proximalen Tubulus nach Schädigung einzelner proximaler Tubuluszellen	66

Abbildung 39: Mögliche strukturelle Änderung der endothelialen Glykokalyx nach ihrer Schädigung

75

9.2 Abkürzungsverzeichnis

ADO	Adenosin
AngII	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintri-phosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	endothelial cell medium
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESL	Endothelial Surface Layer
et al.	und andere
FBS	Fetal Bovine Serum
GFR	Glomerular Filtration Rate
G _{olf}	Olfaktorisches G-Protein
GSC	Glomerular sieving coefficient
h	Stunde
HPSE1	Heparanase1
HRGEC	human renal glomerular endothelial cells
ICAM1	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül1
IgG	Immunglobulin G
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LSM	Laser Scanning Microscope
LY	Lucifer yellow
mg	Milligramm

ml	Milliliter
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mup	major urinary protein
MWF	Munich Wistar Froemter
NaCl	Natriumchlorid
nl	Nanoliter
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rU	relative units
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
snGFR	Single nephron glomerular filtration rate
SNP	Sodium nitroprusside
TGF	Tubulo-glomerulärer Feedbackmechanismus
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Vol%	Volumenprozent
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
%	Prozent

9.3 Kongressbeiträge

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

-**Europhysiology 2018**, London, 14.-16.September 2018

Poster: Acute renal tubular lesions compromise the function of the glomerular filtration barrier: A multiphoton microscopy study

→Posterpreis

-10.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 27.-30. September 2018

Poster: Beeinträchtigung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere nach akuter Schädigung von Tubulusepithelzellen: eine Multiphotonenmikroskopiestudie

→Posterpreis der DGfN

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop für die Vergabe dieses interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihm für das Vertrauen in meine selbstständige Arbeit und dafür, dass er es mir ermöglicht hat einen Teil meiner Ergebnisse auf zwei Kongressen vorzustellen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke für die Übernahme meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine Unterstützung und anregende Kritik bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Uwe De Vries und Frau Dr. Anna-Lena Forst für die Einführung am LSM710 und ihre Hilfe und Unterstützung bei allen auftretenden Fragen und Problemen.

Herrn Bernhard Gess danke ich für die gute Zusammenarbeit und Mithilfe bei der Proteinquantifizierung, sein Engagement bei der Durchführung der Gelelektrophoresen und seine Arbeit in der Zellkultur.

Frau Katharina Fremter danke ich für die Betreuung meiner Versuchsmäuse und die Einarbeitung in die immunhistochemischen Methoden.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Instituts für Physiologie, die zwar nicht direkt an meiner Doktorarbeit beteiligt waren, jedoch mit guten Hinweisen und aufmunternden Worten bei Rückschlägen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank Frau Dr. Katharina Gerl, Frau Michaela Fuchs, Herr Dr. Thomas Neder und ganz besonders Frau Julia Schrankl für eure konstruktiven Vorschläge und die schöne Zeit auf den Kongressen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Mitdoktorandin Vera Ziegler für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die lustigen Stunden im Büro bedanken.

Besonders bedanken möchte ich bei meiner Mitdoktorandin und mittlerweile sehr guten Freundin Frau Maj-Kristina Hellmuth für ihre Unterstützung sowohl in fachlichen als auch privaten Angelegenheiten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, Simone und Werner, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt haben und für mich da waren. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Meinem Freund Florian Axt danke ich herzlich für seine Liebe, seine Unterstützung und seinen moralischen Beistand.