

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität  
Tübingen**

**Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie**

**Direktor: Professor Dr. H. Oßwald**

**Paradoxe Abhängigkeit der glomerulären Filtrationsrate  
von der Kochsalzdiät bei Diabetes mellitus: Bedeutung  
der renalen Innervation**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhards-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Claudia Susanne Birk  
aus  
Tübingen**

**2007**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Vallon

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. U. Häring

**Meinen Eltern**



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Gegenstand der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Bisheriger Kenntnisstand</b>	<b>1</b>
1.2.1	Diabetes mellitus	1
1.2.2	Kurzer Überblick über die Anatomie und Physiologie der Niere	3
1.2.3	Entwicklung, Bedeutung und Thesen zur Entstehung der diabetischen Nephropathie	7
1.2.4	Paradoxe Antwort auf NaCl-arme Diät, Bedeutung des Salzparadoxons für die Frühphase des Diabetes mellitus	13
1.2.5	Bedeutung der Nierenerven für die Nierenfunktion einschließlich der proximalen Reabsorption	16
<b>1.3</b>	<b>Eigene Fragestellung</b>	<b>19</b>

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Experimenteller Ablauf</b>	<b>20</b>
2.1.1	Versuchsgruppen	20
2.1.2	Haltungsbedingungen	22
2.1.3	Induktion des Diabetes mellitus	22
2.1.4	Denervierung der Nieren	23
2.1.5	Präparation für das terminale Clearanceexperiment	25
2.1.6	Infusionslösungen	27
2.1.7	Zeitlicher Ablauf der Clearanceexperimente und Probenentnahme	28
2.1.8	Nierenentnahme	28
<b>2.2</b>	<b>Analytik</b>	<b>29</b>
2.2.1	Urinvolumen	29
2.2.2	Hämatokrit	29
2.2.3	Elektrolytkonzentrationen in Plasma und Urin	29
2.2.4	<sup>3</sup> H-Inulinmessung in Plasma und Urin	30
2.2.5	Noradrenalinbestimmung im Nierenparenchym	30

<b>2.3</b>	<b>Berechnungen und Statistik</b>	<b>36</b>
2.3.1	Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD)	36
2.3.2	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	36
2.3.3	Elektrolytausscheidung	36
2.3.4	Fraktionelle Natrium- und Kaliumausscheidung	37
2.3.5	Statistische Methoden	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Clearanceexperimente - Ergebnisse der einzelnen Gruppen</b>	<b>38</b>
3.1.1	Kontrolltiere (Schein-KON)	38
3.1.2	Denervierte Tiere (KON-DNX)	39
3.1.3	Denervierte Tiere mit NaCl-armer Diät (KON-DNX-DIÄT)	40
3.1.4	Diabetische denervierte Tiere (KON-DNX-STZ)	41
3.1.5	Diabetische denervierte Tiere mit NaCl-armer Diät (KON-DNX-STZ-DIÄT)	42

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Versuchsbedingungen	50
4.2	Effekte der renalen Denervierung auf das Salzparadoxon	50
4.3	Therapeutische Optionen	54
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>





## **1. Einleitung**

### **1.1 Gegenstand der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der paradoxen Wirkung der Kochsalzdiät auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei Diabetes mellitus. Insbesondere untersucht die vorliegende Arbeit die Bedeutung der Nierennerven unter diesen Bedingungen. Am Rattenmodell wurde deshalb die Wirkung einer renalen Denervierung auf die diabetische Niere und das Salzparadoxon untersucht.

### **1.2 Bisheriger Kenntnisstand**

#### **1.2.1 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus ist weltweit die häufigste Stoffwechselerkrankung und die Prävalenz der Neuerkrankungen steigt weiter. So wird sich die globale Zahl der Diabetiker von ca. 150 Millionen im Jahr 2000 auf 300 Millionen bis zum Jahr 2025 verdoppeln (30). In Deutschland sind knapp 5% der Bevölkerung, d.h. 4 Millionen Bürger Diabetiker, davon 90% Typ II. Da aber insbesondere der Typ II Diabetes in seinen Anfangsstadien eine asymptomatische Erkrankung ist, muss von einer beträchtlichen Dunkelziffer ausgegangen werden.

Je nach Ursache und Verlauf unterscheidet man mehrere Typen des Diabetes mellitus, wobei hier nur die zwei wichtigsten angesprochen werden. Der Diabetes Typ I (früher insulin-abhängiger Diabetes mellitus) macht ca. 5-7% aller Diabetiker aus und manifestiert sich in der Regel vor dem 40. Lebensjahr. Ursache ist eine  $\beta$ -Zelldestruktion des Pankreas, die zum absoluten Insulinmangel führt, hervorgerufen durch Autoimmunprozesse (Nachweis von Autoantikörper in 70-90%, wie z.B. Inselzellantikörper oder

Insulinautoantikörper) z.B. nach Virusinfektionen, durch toxische Einflüsse oder durch genetische Disposition (>90% der Patienten haben die HLA-Merkmale DR3 und/oder DR4).

Der Diabetes Typ II (früher nicht-insulin-abhängiger Diabetes mellitus, Altersdiabetes), der ca. 95% der Diabetiker umfasst, manifestiert sich gewöhnlich im mittleren und höheren Lebensalter. Pathogenetisch spielen zwei Störungen eine Rolle: Die gestörte Insulinsekretion und die herabgesetzte Insulinwirkung (Insulinresistenz), bedingt durch einen Insulinrezeptordefekt und gestörte Glukoseverwertung der Zelle. Der Diabetes Typ II ist häufig mit Adipositas, Bluthochdruck und Hyperlipidämie (metabolisches Syndrom), aber auch mit psychosozialen Faktoren wie Überernährung und Bewegungsmangel verbunden.

Klinisch wird der Diabetes Typ I relativ rasch symptomatisch, während sich der Typ II langsam, schleichend manifestiert und so anfangs häufig unbemerkt bleibt. Gemeinsam sind beiden Formen unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Leistungsminderung, Symptome durch Hyperinsulinismus und passagere Hypoglykämien wie Heißhunger, Schwitzen, Kopfschmerzen, Symptome infolge Hyperglykämie und Glukosurie mit osmotischer Diurese: Polyurie, Durst, Polydipsie und Gewichtsverlust. Als akute, ja lebensbedrohliche Komplikationen treten das hypoglykämische und hyperglykämische osmolare Koma auf.

Entscheidend für die Prognose des Patienten ist jedoch insbesondere das Auftreten von Spätkomplikationen, hier vor allen die diabetischen Gefäßschädigungen wie eine unspezifische Makroangiopathie und die diabetesspezifische Mikroangiopathie mit Verdickung der kapillären Basalmembranen. Zeichen der Makroangiopathie sind eine erhöhte Häufigkeit von koronarer Herzkrankheit (55% der Diabetiker versterben an Herzinfarkt), ischämischen Hirninfarkten und peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten (7). Bei der Mikroangiopathie spielt die Verdickung der kapillären Basalmembranen eine Rolle mit den daraus folgenden Auswirkungen: verstärkte Glykosylierung von Proteinen mit nachfolgenden Funktionsveränderungen, Änderung der Zusammensetzung der Basalmembran

mit Permeabilitätsstörungen (53), Anhäufung von Sorbit in bestimmten Zelltypen mit konsekutiv vermehrter Wassereinlagerung und sekundäre Mikrothrombosen. Folge dieser Gefäßveränderungen sind Endorganschäden im Bereich des Auges (Retinopathie), des Herzens (small vessel disease), der Haut, des Nervensystems (Neuropathie und neuropathischer diabetischer Fuß) und insbesondere der Niere im Sinne einer diabetischen Nephropathie (Glomerulosklerose).

Die Pathogenese der diabetischen Nephropathie ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und deshalb sollen relevante Aspekte der Nierenanatomie und -physiologie kurz vorgestellt werden.

### **1.2.2 Kurzer Überblick über die Anatomie und Physiologie der Niere**

Die Niere ist das wichtigste Organ zur Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Säure-Basen-Haushaltes und zur Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Fremdstoffen. Über Bildung von Hormonen beeinflusst die Niere nicht nur den Mineralhaushalt (Calcitriol), sondern auch die Blutdruckregulation (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System).

Dabei stellen die etwa 1 Million Nephrone je Niere die funktionellen Einheiten der Niere dar. Sie bestehen aus dem Glomerulum, dem sich in der Gefäßgabel zwischen Vas afferens und Vas efferens die Pars recta distalis des Nierentubulus unmittelbar anlegt und dort die Macula densa bildet, der Bowman'schen Kapsel, dem in ihr gelagerten glomerulären Kapillarkonvolut sowie dem Tubulussystem, welches in drei Abschnitte unterteilt werden kann:

- proximaler Tubulus (proximales Konvolut und gerader Teil des proximalen Tubulus): hier werden etwa 60% des filtrierte Natrium, Chlorid und Wassers sowie Glukose und Aminosäuren fast komplett rückresorbiert.
- Henle'sche Schleife (absteigender Schenkel, Überleitungsstück, sowie dünner und dicker aufsteigender Schenkel): Die in den Henle'schen Schleifen vereinigten Tubulusabschnitte agieren funktionell zusammen und wirken bei der Harnkonzentrierung bzw. -verdünnung mit. Im dicken

aufsteigenden Schenkel werden etwa 20-30% des filtrierten Natrium und Chlorid rückresorbiert.

- Macula densa: Am Ende des dicken aufsteigenden Schenkels findet sich die Macula densa. Diese tritt in physischen Kontakt mit dem vaskulären Pol desselben Nephrons und ist durch das tubuloglomeruläre Feedback-System (TGF) an der Regulation der glomerulären Filtrationsrate desselben Nephrons beteiligt. Der TGF ist von besonderer Bedeutung für die untersuchte Thematik und wird deshalb weiter unten genauer dargestellt.
- distaler Tubulus und Verbindungstubulus (distales Konvolut): In diesen Abschnitten werden etwa 10-20% des filtrierten Natrium und Chlorid rückresorbiert sowie Kalium sezerniert. Hormonell wird die Salzreabsorption und Kaliumsekretion durch Aldosteron reguliert.

An das distale Konvolut schließt sich das Sammelrohr an, welches in das Nierenbecken führt. In den Sammelrohren erfolgt unter dem stimulierendem Einfluss des antidiuretischen Hormons (ADH) die Resorption von Wasser und damit die endgültige Konzentrierung des Harns.

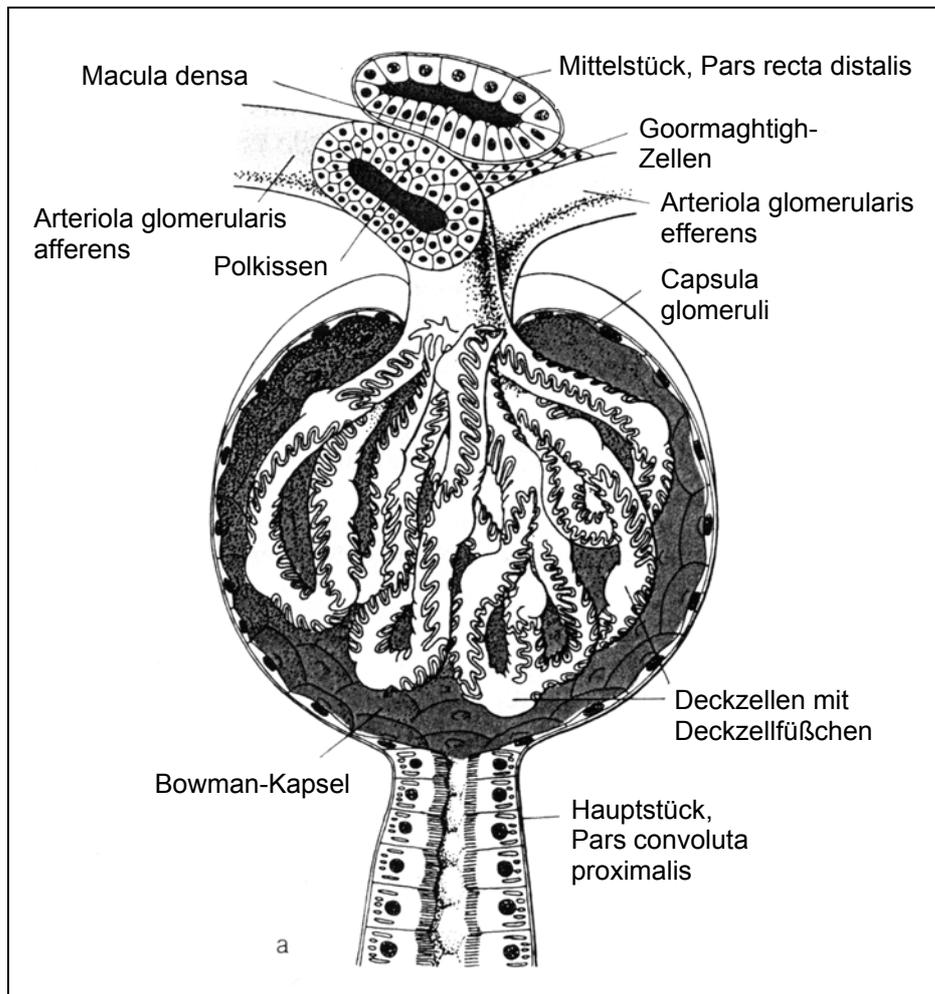


Abb. 1: Nierenkörperchen (Glomerulum), plastische Rekonstruktion; aus Schiebler, Schmidt, Zilles; Anatomie, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

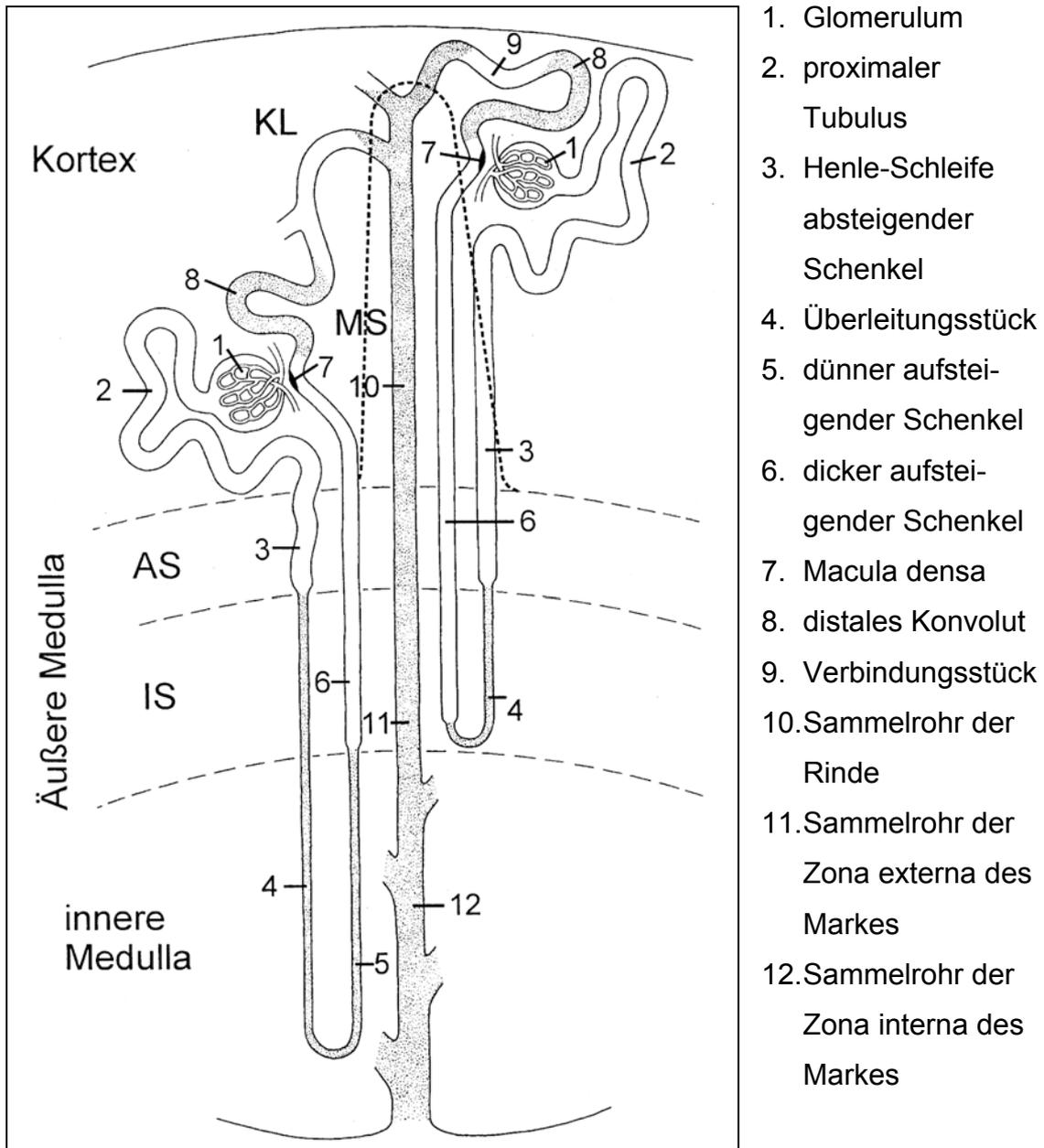


Abb. 2: schematischer Aufbau des Nephrons (Quelle: Prof. W. Kriz, Heidelberg)

Das Prinzip der Regulation des Salzhaushaltes durch die Nieren besteht darin, dass von dem durchfließenden Blut in den Glomerula ein Ultrafiltrat

(Primärharn) in die proximalen Nierentubuli abgepresst, davon etwa 99% entlang des Tubulus wieder rückresorbiert wird (etwa 5-10% unter Kontrolle von Aldosteron) und dann der restliche Harn über die Sammelrohre in die Nierenkelche abfließt. Das Ultrafiltratvolumen, das pro Zeiteinheit gebildet wird (Glomeruläre Filtrationsrate = GFR), beträgt beim Menschen etwa 180 l/Tag und die Harnflussrate etwa 1-2 l/Tag.

### **1.2.3 Entwicklung, Bedeutung und Thesen zur Entstehung der diabetischen Nephropathie**

Die diabetische Nephropathie gehört zu den häufigsten Todesursachen bei Diabetikern und macht einen wesentlichen und zunehmenden Anteil unter denjenigen Erkrankungen aus, die zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz führen. Eine aktuelle bundesdeutsche Erhebung ermittelte einen Anteil der Diabetiker von 42% unter den neu dialysepflichtig gewordenen Patienten (34).

Die diabetische Nephropathie manifestiert sich bei 30-40% der Patienten mit Diabetes Typ I ca. 10-15 Jahre nach Erstmanifestation des Diabetes (31). Zunehmend wird sie auch bei älteren Patienten mit Typ II-Diabetes beobachtet. Die diffuse diabetische Glomerulosklerose ist dabei die häufigste Läsion, sie besteht aus einer diffusen Volumenzunahme der mesangialen Matrix und einer Verdickung der Basalmembran. Dazu kommen verschiedene exsudative Läsionen wie kapsuläre Ausziehungen und Fibrinkappen und hyaline Arteriosklerose, wie z.B. der efferenten Arteriole. Die noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson-Syndrom) ist spezifisch für den Diabetes mellitus. Hier kommt es auf dem Hintergrund einer Zunahme der mesangialen Matrix zu PAS-positiven, laminierten, intrakapillären Knötchen, an deren Peripherie offene glomeruläre Kapillarschlingen zu sehen sind.

Die diabetische Nephropathie wird in fünf Stadien eingeteilt:

Im ersten Stadium (Hypertrophiestadium), etwa vom Zeitpunkt der klinischen Erstdiagnose des Diabetes bis zwei Jahre danach, werden eine glomeruläre Hyperfiltration und Hypertrophie beobachtet, die glomeruläre Filtrationsrate ist um 20-50% erhöht (74).

Zwei bis fünf Jahre danach findet man im zweiten Stadium (Latenzphase) histologische Veränderungen der Niere wie Verdickung der kapillaren Basalmembran und Ausweitung des Mesangiums, die Albuminausscheidung ist noch normal, es bestehen meist keine klinischen Anzeichen einer Nierenerkrankung.

Das dritte Stadium (beginnende diabetische Nephropathie) erreichen die Betroffenen nach ca. 10 Jahren. Die GFR ist nun nur noch leicht erhöht, mit abnehmender Tendenz, der Blutdruck ist erhöht und es setzt eine Mikroalbuminurie (30-300 mg/d) ein, die als „früher“ Schädigungsmarker für die manifeste Nephropathie (Teststreifen-Screening) verwendet wird. Ein systemischer Eiweißverlust ist jedoch noch nicht nachweisbar.

Im anschließenden vierten Stadium (klinisch manifeste Nephropathie) nimmt die GFR um 10 ml/min/Jahr ab, es zeigen sich Ödeme, Proteinurie (>300 mg/d), arterielle Hypertonie. Morphologische Veränderungen der Niere im Sinne einer diffusen nodulären Glomerulosklerose zeigen sich nun durch Mesangium- (32, 52) und Basalmembranverbreiterung (44) und durch Eiweiß- und Fibrinablagerungen (51).

Bei etwa 30% der Diabetiker folgt ca. 15-30 Jahre nach Erstmanifestation des Diabetes Stadium fünf mit der terminalen Niereninsuffizienz. Die GFR ist stark gesunken (<10 ml/min), die Retentionswerte wie z.B. Kreatinin sind stark gestiegen, eine arterielle Hypertonie findet sich bei ca. 90% aller Kranken.

Die Pathogenese der diabetische Nephropathie ist immer noch nicht hinreichend geklärt. Sicherlich spielt aber die glomeruläre Hyperfiltration größerer Mengen an Proteinen und Wachstumsfaktoren eine Rolle, die normalerweise in der proximaltubulären Flüssigkeit nicht in dieser Masse vorhanden sind und die eine kortikointerstitielle Entzündung induzieren (1,2).

Auch wenn glomeruläre Veränderungen häufig bei Diabetes beobachtet werden, so ist doch die aus der kortikointerstitiellen Entzündung resultierende tubulointerstitielle Fibrose zu einem großen Ausmaß bestimmend für das Fortschreiten der renalen Erkrankung (9, 16, 19, 36). Damit sind Mechanismen, die zur initialen glomerulären Hyperfiltration führen und so die glomeruläre Filtration von Proteinen und Wachstumsfaktoren fördern, von großer pathophysiologischer und möglicherweise therapeutischer Bedeutung. Als verantwortlich diskutiert werden hierfür hämodynamische Faktoren, die den intraglomerulären Druck erhöhen, als auch metabolische Faktoren.

Zu den metabolischen Faktoren gehört die Glukotoxizität: Glucose reagiert nichtenzymatisch mit freien Aminogruppen und wird unter mehreren Oxidationsschritten zu „advanced glycation end products“ (AGE) umgeformt. Die Folge sind Quervernetzungen zwischen einzelnen Peptidketten, veränderte Strukturen und Funktionen der extrazellulären Matrix, wie z.B. der glomerulären Basalmembran (74) mit dem Verlust der physiologischen Funktion (37). Zudem kann die glukotoxische Wirkung der Hyperglykämie zu gestörter Endothelzellfunktion führen. Belegt wird dies bei diabetischen Patienten durch erhöhte Proreninspiegel, Willebrand-Faktor-Aktivität, Thrombomodulin und andere Indikatoren. Es wurde postuliert, dass die Albuminurie lediglich der renale Ausdruck einer generalisierten endothelialen Schrankenstörung sei (17). Eingriffe, welche den glomerulären Filtrationsdruck vermindern, wie eiweißbeschränkte Kost oder ACE-Hemmer, führen beim Diabetiker zum Rückgang der Proteinurie und im Tierexperiment zu vermindertem Auftreten glomerulärer Läsionen.

Die Erhöhung des glomerulären Druckes beim Diabetes kommt durch Abfall des präglomerulären Gefäßwiderstandes zustande: die präglomerulären Gefäße sind vasodilatiert (27). Dies macht verständlich, weshalb das Glomerulum schon durch geringe Steigerung des Blutdrucks geschädigt wird. Wegen der afferenten Vasodilatation pflanzt sich ein größerer Anteil des Aortendrucks in das glomeruläre Gefäßbett fort. Selbst bei normalem Blutdruck steigt der glomeruläre Kapillardruck schon an (kapilläre Hypertonie); der

Anstieg ist aber besonders ausgeprägt, wenn zusätzlich ein arterieller Hochdruck besteht. Die Folge ist eine Steigerung des renalen Plasmaflusses und somit eine Steigerung des Perfusionsdruckes (27), eine glomeruläre Hyperfiltration setzt ein.

Das Risiko der Nierenschädigung ist bei unterschiedlichen Modellen des Nierenversagens besonders dann erhöht, wenn die Glomeruli hypertrophiert sind. Bei Diabetes mellitus liegt häufig eine Vergrößerung der Niere vor. Insbesondere der Einfluss von Wachstumsfaktoren, wie z.B. des transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) oder des vascular endothelial growth factor (VEGF) werden diskutiert. Auch Angiotensin II ist ein potenter Wachstumsfaktor; vermutlich stimuliert es die TGF- $\beta$ 1-Produktion und induziert dadurch eine Hypertrophie (72). Infolge der intrarenalen Wachstumsvorgänge erhöht sich das Nierengewicht (13).

Die besondere Empfindlichkeit des hypertrophierten Glomerulus gegenüber Schädigungen könnte somit zum Teil mechanisch (erhöhte kapilläre Wandspannung nach dem Laplace-Prinzip) oder biochemisch (vermehrte Zytokinbildung und Proliferationsbereitschaft) begründet sein.

Von besonderer Wichtigkeit beim Frühdiabetes ist damit die glomeruläre Hyperfiltration, die auch als ein Risikofaktor für die fortschreitende diabetische Nephropathie in einer Anzahl von Studien genannt wurde (15, 41, 42, 48), obgleich nicht alle Studien dies zeigen konnten (29, 33). Wie erwähnt kann die glomeruläre Hyperfiltration bei Diabetes den Zugang der vorgenannten Proteine und Wachstumsfaktoren zu dem proximalen Tubulus erleichtern und dies kann zu der Verbindung zwischen glomerulärer Hyperfiltration, tubulointerstitieller Fibrose und diabetischer Nephropathie beitragen. Die bis vor kurzem vorherrschende Meinung war, dass die glomeruläre Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus bedingt ist durch einen primären Defekt in der mikrovaskulären Funktion und/oder eine Imbalance vasoaktiver Hormone.

Im Gegensatz dazu vertreten wir (die Arbeitsgruppe von Volker Vallon) ein „tubulozentrisches Konzept“, in dem die glomeruläre Hyperfiltration, wie im folgenden genauer ausgeführt, hauptsächlich aus primären Veränderungen im

Tubulussystem herrührt (56, 64, 67). Es gibt überzeugende Befunde für einen primären Anstieg der Flüssigkeits- und Elektrolytreabsorption im proximalen Tubulus bei Patienten in der Frühphase eines Typ I Diabetes mellitus (11, 25), als auch bei Ratten mit experimentell (Streptozotocin (STZ))-induziertem Typ I Diabetes mellitus (4, 45, 55, 60, 64).

Im Rahmen des TGF wird eine Zunahme der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen in der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa über einen  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter registriert, über Adenosin kommt es zu einer Aktivierung von Adenosin A1-Rezeptoren, dies führt zur Konstriktion des Vas afferens und Abnahme der GFR (67). Der TGF dient unter anderem der Anpassung der glomerulären Filtration an die Transportkapazität von proximalen Tubulus und Henle-Schleife. Hält der Transport in den beiden Segmenten mit der Filtration nicht Schritt, dann steigt die Kochsalzkonzentration an der Macula densa und die GFR wird durch Kontraktion des Vas afferens gesenkt. Auf diese Weise wird verhindert, dass bei eingeschränkter Transportkapazität von proximalem Tubulus und Henle-Schleife (z.B. durch nephrotoxische Substanzen) Kochsalz- und Wasserverluste auftreten, die sonst angesichts der geringen Transportkapazität des distalen Tubulus und Sammelrohrs unvermeidlich wären.

Betrachtet man diese Regulationsvorgänge unter dem Einfluss des Diabetes mellitus, so entwickelt sich unsere tubulärzentrische Sicht der glomerulären Hyperfiltration (61, 66):

Der primäre Anstieg der tubulären Reabsorption bei Frühdiabetes ist das kombinierte Ergebnis eines gesteigerten  $\text{Na}^+$ /Glukose-Kotransportes und des diabetes-induzierten tubulären Wachstums. Der gesteigerte  $\text{Na}^+$ /Glukose-Kotransport wiederum ist die Konsequenz eines Hyperglykämie-induzierten Anstiegs der glomerulär filtrierte Glukosemenge und einer verstärkten Expression des  $\text{Na}^+$ /Glukose-Kotransporters [SGLT] im proximalen Tubulus (55, 64, 68). Erhöhte Glukosewerte (filtrierte Glukose nimmt bei Hyperglykämie zu) führen so zur verstärkten  $\text{Na}^+$ -Rückresorption durch  $\text{Na}^+$ -/Glukose-Kotransporter (SGLT 1 und 2) im proximalen Tubulus. Der daraus folgende primäre Anstieg des tubulären Transportes, die Zunahme der tubulären Länge

und Reabsorption stromaufwärts der Macula densa (55, 60, 64) führen zur Erniedrigung der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen an der Macula densa. Diese Konzentrationsänderungen registriert das tubuloglomeruläre Feedback-System (TGF) und induziert reziproke Veränderungen in der GFR, d.h. eine Zunahme der GFR desselben Nephrons (single nephron; SNGFR; 50, 61, 63). Diese TGF-abhängige Erhöhung der GFR dient zur Stabilisierung der Flüssigkeits- und  $\text{NaCl}$ -Beladung des Nephronabschnittes distal der Macula densa, in welchem die Feinregulation der renalen Ausscheidung unter hormoneller Kontrolle (z.B. Aldosteron und Vasopressin) stattfindet (67). Somit werden der Fluss und die Elektrolytbeladung im distalen Tubulus wiederhergestellt und eine feine Einstellung der Reabsorption und Ausscheidung gemäß den körperlichen Bedürfnissen ermöglicht. Damit ist die glomeruläre basale Hyperfiltration beim frühen Diabetes mellitus die Folge einer primären proximalen tubulären Hyperreabsorption und der normalen Physiologie des TGF-Systems (siehe auch Abb. 3, Nephron A). Hinweise, dass eine gesteigerte tubuläre Reabsorption die diabetische Hyperfiltration verursacht, gibt es auch bei „hyperfiltrierenden“ menschlichen Diabetikern, bei denen die fraktionelle proximale Reabsorption erhöht ist und positiv mit der GFR korreliert (25).

Schließlich vermindert eine pharmakologische Hemmung des frühdiabetischen tubulären Wachstums und des proximalen  $\text{Na}^+$ /Glukose-Kotransportes sowohl die proximale Hyperreabsorption als auch die glomeruläre Hyperfiltration (55, 64). Ebenso führt eine (pharmakologische) Erhöhung der kortikalen interstitiellen Konzentration von Adenosin, das als Mediator des TGF fungiert (54, 61), zur Normalisierung der GFR in STZ-diabetischen Ratten (58). Damit identifiziert das umrissene pathophysiologische Konzept eine erhöhte proximale tubuläre Reabsorption, bedingt durch gesteigerten  $\text{Na}^+$ /Glukose-Kotransport und Nierenwachstum, als einen potentiellen Ansatzpunkt für die Prävention renaler hämodynamischer Veränderungen beim frühen Diabetes mellitus mit dem Ziel, die späteren Schäden von der Niere abzuwenden. Um eine möglichst effektive Prävention zu erreichen, ist es wichtig, die frühen Prozesse, die die progressive Krankheit initiieren, zu identifizieren und zu verstehen. Daher konzentriert sich die Arbeitsgruppe von Dr. Vallon auf die frühen funktionellen

Ereignisse in der diabetischen Niere mit besonderer Fokussierung auf die Entstehung der glomerulären Hyperfiltration und das Phänomen des Salzparadoxons, welches im Folgenden erläutert wird.

#### **1.2.4 Paradoxe Antwort auf NaCl-arme Diät, Bedeutung des Salzparadoxons für die Frühphase des Diabetes mellitus**

Neben einer verstärkten basalen glomerulären Hyperfiltration (8) verändert der Diabetes auch die renal hämodynamische Antwort auf Veränderungen der diätetischen NaCl-Zufuhr: Unter der Annahme, dass durch eine Aktivierung des RAS durch Salzrestriktion die glomeruläre Hyperfiltration verhindert werden kann, hatte die Gruppe von Dr. Vallon bei STZ-diabetischen Ratten mit kochsalzärmer Diät Clearanceexperimente durchgeführt (61). Der Organismus versucht, das Salz, welches sich im Körper befindet, zu konservieren und weniger auszuscheiden. Hierzu könnte eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate beitragen. Interessanterweise zeigte sich jedoch der gegenteilige Effekt. Die NaCl-arme Diät führte bei diesen diabetischen Ratten zu einer Steigerung des renalen Blutflusses, der GFR und des Nierengewichts, wobei bei nichtdiabetischen Kontrolltieren keine signifikante Änderung eintrat (59). Unter einer Hochsalzdiät wurde unter gleichen Bedingungen bei diabetischen Tieren eine renale Vasokonstriktion gefunden und der paradoxe Effekt der Salzdiät auch auf Ebene des einzelnen Nephrons durch Mikropunktion bestätigt (62, 65).

Dieses Phänomen wurde zuerst bei diabetischen Ratten gefunden (59, 62, 65) und kurze Zeit später auch beim Menschen beobachtet. Miller fand 1997, dass junge Patienten mit Diabetes mellitus Typ I auf eine kochsalzarme Diät mit renaler Vasodilatation und einem Anstieg der GFR reagierten (38). 2002 zeigten Luik et al. (35), dass kurzzeitige moderate Natriumrestriktion eine relative Hyperfiltration beim unkomplizierten Diabetes mellitus Typ I induziert. Diese inverse Beziehung der diätetischen NaCl-Zufuhr zu der GFR beim Diabetes bezeichnen wir als das „Salzparadoxon“ der diabetischen Niere.

„Paradox“ deshalb, weil die Änderungen der GFR sich paradox bezüglich der Salzhomöostase verhalten.

Das Salzparadoxon wird durch einen Wechsel des Kräftegleichgewichts zwischen TGF und anderen neurohumeralen Regulatoren der glomerulären Filtration erklärt. Die Gruppe von Dr. Vallon fand, dass der Diabetes die proximal tubuläre Reabsorption empfindlicher auf Veränderungen in der Salzdiät macht (65). Diese erhöhte Salzsensitivität des proximalen Tubulus führt zur verstärkten  $\text{Na}^+$ -Resorption im proximalen Tubulus bei salzarmer Diät, einer entsprechenden Änderung der Elektrolytkonzentrationen an der Macula densa und über den TGF zur weiteren Zunahme der GFR. Eine salzreiche Diät führt zu entgegengesetzten Veränderungen (65). Dagegen reguliert eine nicht-diabetische Ratte die Reabsorption bei Änderung der Salzzufuhr primär stromabwärts der Macula densa im Aldosteron-sensitiven Segment und damit werden keine paradoxen Änderungen der GFR beobachtet (65).

Der Mechanismus, der den diabetischen proximalen Tubulus sensitiver auf die Salzdiät macht, ist nicht bekannt. Angiotensin II und die renalen Nerven sind prominente Effektoren, die die proximale Reabsorption mit dem Gesamtkörpersalzgehalt verbinden (61) und deshalb Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung der Nierenerven.

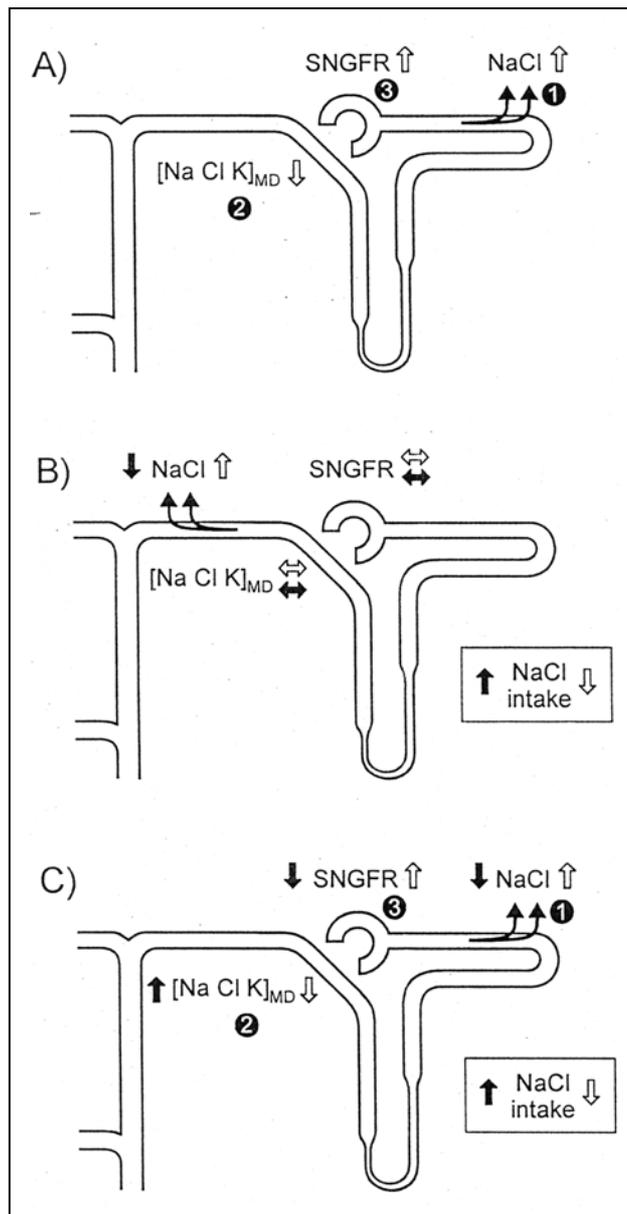


Abb. 3: Beeinflussung der glomerulären Filtrationsrate eines einzelnen Nephrons (SNGFR) unter Änderung der Kochsalzzufuhr (nach Vallon V. et al: The Salt Paradox and Its Possible Implications in Managing Hypertensive Diabetic Patients [61])

SNGFR: GFR eines Nephrons

NaCl: NaCl-Resorption

$[Na\ Cl\ K]_{MD}$ : Konzentration von  $Na^+$ ,  $Cl^-$  und  $K^+$  an der Macula densa

NaCl intake: Änderung der Kochsalzzufuhr

Schaubild Nephron A: Basale glomeruläre Hyperfiltration beim Frühdiabetes. Die Hyperglykämie verursacht einen primären Anstieg der proximal tubulären NaCl-Reabsorption durch verstärkten Na<sup>+</sup>-/Glukose-Kotransport und tubuläres Wachstum (1). Verstärkte Reabsorption reduziert das TGF-Signal an der Macula densa ([Na Cl K]<sub>MD</sub>) (2) und erhöht über den TGF die GFR eines Nephrons (SNGFR) (3).

Schaubild Nephron B: Physiologische Situation bei Änderung der NaCl-Zufuhr. Auf eine Änderung der Kochsalzdiät reagiert die nichtdiabetische Niere hauptsächlich mit Veränderungen der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Transportvorgänge stromabwärts der Macula densa, d.h. mit einer Rückresorption im distalen Tubulus bzw. Sammelrohr unter Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Dabei findet keine Änderung des TGF-Signals und der SNGFR statt.

Schaubild Nephron C: Pathophysiologische Situation bei Diabetes mellitus: Im NaCl-sensitiven proximalen Tubulus (siehe oben) finden entsprechend der Kochsalzdiät (1) Änderungen der proximalen Reabsorption mit folgender Änderung des TGF-Signals (2) und der SNGFR (3) statt:

Kochsalzarme Diät führt zu stärkerer Rückresorption im proximalem Tubulus (1), die Elektrolytkonzentrationen an der Macula densa sinken ([Na Cl K]<sub>MD</sub>) und über den TGF steigt die SNGFR (3); unter kochsalzreicher Diät kommt es umgekehrt zum Anstieg der Elektrolytkonzentrationen an der Macula densa (2) und somit zur Abnahme der SNGFR. Diese verminderte Rückresorption verhindert/verlangsamt das tubuläre Wachstum und die renale Hypertrophie und könnte auch so die diabetische Nephropathie positiv beeinflussen.

### **1.2.5 Bedeutung der Nierennerven für die Nierenfunktion einschließlich der proximalen Reabsorption**

Die Innervation der Niere erfolgt über afferente und efferente Nervenfasern, parasympathisch und sympathisch aus dem Ganglion coeliacus, mesentericum superius und dem Plexus aorticus mit Fasern von Sympathikus, N. vagus, N. phrenicus und den Nn splanchnici major und minor. Vom Verlauf her begleiten die Nervenfasern die renale Arterie und Vene beim Eintritt in den Hilus der

Niere und darüber hinaus bis in die vaskulären Segmente des renalen Kortex und der äußeren Medulla.

Botenstoffe der efferenten Innervierung sind adrenerge, dopaminerge, cholinerge und andere Neurotransmitter wie z.B. das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) oder die Substanz P. Eine wichtige Rolle kommt dabei dem Neurotransmitter Noradrenalin (Norepinephrin) zu: bei abnehmender renaler sympathischer Nervenaktivität durch chronisch renale Denervation sinkt die Nierengewebskonzentration von Noradrenalin um 95% (18), bei gesteigerter Nervenaktivität steigt sie an (18). Die renalen sympathischen Nerven innervieren die Tubuli, die Gefäße und die Renin-enthaltenden juxtaglomerulären granulären Zellen der Niere. Anstiege in der renalen sympathischen Nervenaktivität können so die Nephronfunktion regulieren (18, 19).

In Mikropunktionsexperimenten fand man, dass eine gesteigerte sympathische Nervenstimulation zu einem frequenzabhängigen Abfall der glomerulären Filtrationsrate des einzelnen Nephrons (single nephron, SNGFR) führt. Verantwortlich für diesen Abfall der GFR sind Anstiege sowohl des afferenten und des efferenten glomerulären arteriolen Widerstandes als auch ein Abfall des glomerulären hydrostatischen Druckgradienten ( $\Delta P$ ) und des glomerulären Ultrafiltrationskoeffizienten (Kf), verursacht durch eine Kontraktion des Mesangiums und gleichzeitige Verringerung der Filtrationsoberfläche.

Veränderungen der efferenten renalen sympathischen Nervenaktivität (ERSNA) tragen zur Regulierung des renalen Blutflusses, der GFR, des Wassertransportes und der hormonellen Ausschüttung bei (18). So führt eine Stimulation der renalen Nerven zu vermehrter, dagegen eine renale Denervation zu einer verminderten proximalen tubulären Wasser- und Elektrolytreabsorption (46). Anstiege der renalen sympathischen Nervenaktivität senken die Natrium- und Wasserausscheidung im Urin durch Steigerung der renalen tubulären Wasser- und Natriumreabsorption entlang des gesamten Nephrons und steigern die Aktivität des RAAS (Angiotensin II) durch Stimulierung der Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären granulären

Zellen. Eine akute renale Denervierung führt zum Phänomen der Diurese und Natriurese, wie erstmals von Claude Bernard 1939 beschrieben (18).

Es folgt ein Anstieg der Harnflussrate und eine Reduktion der Urinosmolarität (21). Die ipsilaterale Diurese und Natriurese sind nicht mit Veränderungen in der totalen Nieren-GFR oder SNGFR verbunden (siehe oben). Die abfallende proximal tubuläre Reabsorption von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und Wasser, die auf akute oder chronisch renale Denervierung folgt, ist unabhängig von Veränderungen im renal interstitiellen hydrostatischen Druck und den peritubulären kapillären onkotischen und hydrostatischen Drücken. Renale Denervierung betrifft den proximal tubulären Transport einer Vielzahl von Substanzen und verstärkt die Ausscheidung (und senkt den maximalen tubulären Transport) von  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , Phosphat, Glukose und Harnsäure, übereinstimmend mit der Vorstellung, dass die ERSNA möglicherweise generell die renal proximal tubulären Transportprozesse reguliert.

Gleichzeitig wurde eine schwächere Natrium- und Kaliumreabsorption in den Henle'schen Schleifen und eine schwächere Wasser-, Natrium- und Bikarbonatreabsorption (jedoch eine gesteigerte Kaliumsekretion) im distalen tubulären Konvolut beobachtet (6, 69).

Eine renale Denervierung beeinträchtigt nicht den renalen Blutfluss (RBF), den systemischen Blutdruck oder den renal vaskulären Widerstand, senkt aber den renalen Renin-Gehalt, die renale Renin-mRNA und die renal venöse Plasma-Renin-Aktivität. (19, 26). D.h. die basale Renin-Sekretionsrate ist abhängig von intakten renalen sympathischen Nerven (28). Nach renaler Denervierung war die steigernde Wirkung von Angiotensin II auf die proximal tubuläre Chlorid- und Wasserreabsorption um 75% reduziert. Dies impliziert, dass nur ein kleiner Teil der Angiotensin II-Wirkung (~25%) direkt durch Einfluss auf Angiotensin II-Rezeptoren an den proximalen Tubuli bedingt ist. Der Hauptteil der Wirkung ist abhängig von einer intakten Innervierung und damit möglicherweise die Folge einer Freisetzung von Noradrenalin bedingt durch Aktivierung von Angiotensin II AT-1-Rezeptoren auf präsynaptischen Nervenendigungen.

Führt man nun eine unilaterale renale Denervierung durch, führt dies in der betreffenden Niere zu einer ipsilateralen Diurese und Natriurese (siehe oben)

und in der nicht betroffenen Niere reflektorisch zu einer kontralateralen Antidiurese und Antinatriurese in Verbindung mit einem Anstieg der kontralateralen ERSNA. So ist die Gesamtharnflussrate und Natriumausscheidung des Körpers im Urin unverändert und weder die systemische noch die renale Hämodynamik sind verändert (18).

### **1.3 Eigene Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Nierenerven für die paradoxe Wirkung der Kochsalzdiät auf die GFR bei Diabetes mellitus.

Ursache für das Salzparadoxon ist eine erhöhte Sensitivität der Reabsorption im proximalen Tubulus auf Änderung der Salzzufuhr.

Der Mechanismus, der den diabetischen proximalen Tubulus sensitiver für die diabetische NaCl-Zufuhr macht, ist jedoch unbekannt. Da der regulatorische Einfluss der renalen Nerven auf den Salztransport im proximalen Tubulus bekannt ist (18), untersuchen wir die Frage, ob die renalen Nerven die erhöhte Salzsensitivität der diabetischen Niere vermitteln. Dazu untersuchen wir, ob auch eine denervierte diabetische Niere das Salzparadoxon aufweist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Experimenteller Ablauf

#### 2.1.1 Versuchsgruppen

Es wurden fünf Versuchsgruppen (mit jeweils n Tieren) gebildet:

Schein-KON (n=10)	nicht diabetische, nicht denervierte Tiere mit Scheinoperation als Kontrollgruppe
KON-DNX (n=8)	nicht diabetische, denervierte (stets die linke Niere) Tiere
KON-DNX-DIÄT (n=11)	nicht diabetische, denervierte Tiere mit kochsalzarter Diät
KON-DNX-STZ (n=7)	diabetische, denervierte Tiere
KON-DNX-STZ-DIÄT (n=6)	diabetische, denervierte Tiere mit kochsalzarter Diät

Kurzer Überblick über Behandlungsprotokolle/Studiendesign

Alle Tiere verbrachten die Tage bis zum Clearanceexperiment unter kontrollierten Bedingungen und nach Versuchsgruppen getrennt im Tierhaus.

Am ersten Tag der Behandlungsserie wurde bei den Tieren die linke Niere unter Kurznarkose denerviert (DNX) bzw. scheinoperiert (Schein). Zwischen dem dritten und fünften Tag erfolgte die Applikation des Vehikels (Zitratpuffer) für die Tiere der nichtdiabetischen Gruppen bzw. die Applikation von Streptozotocin

(STZ, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) für die Tiere der diabetischen Gruppen. Zwischen dem siebten und elften Tag wurde auf die kochsalzarme Diät (0,15 g Na<sup>+</sup>/kg) umgestellt oder die normale Diät beibehalten (2,5 g Na<sup>+</sup>/kg). Zwischen dem 14. und 18. Tag, also sieben Tage nach Wechsel der Kochsalzdiät, fanden die abschließenden, terminalen Clearanceexperimente statt; die Tiere wurden dazu in unten beschriebener Weise präpariert. Die Katheterisierung der Ureteren gewährleistete den direkten Vergleich der linken und rechten Nierenfunktion. So waren beide Nieren während den Experimenten den gleichen Blutdruckwerten und zirkulierenden Körperhormonen ausgesetzt, jede Differenz zwischen der innervierten rechten und der denervierten linken Niere konnte somit auf die direkten oder indirekten Einflüsse der renalen Nerven zurückgeführt werden.

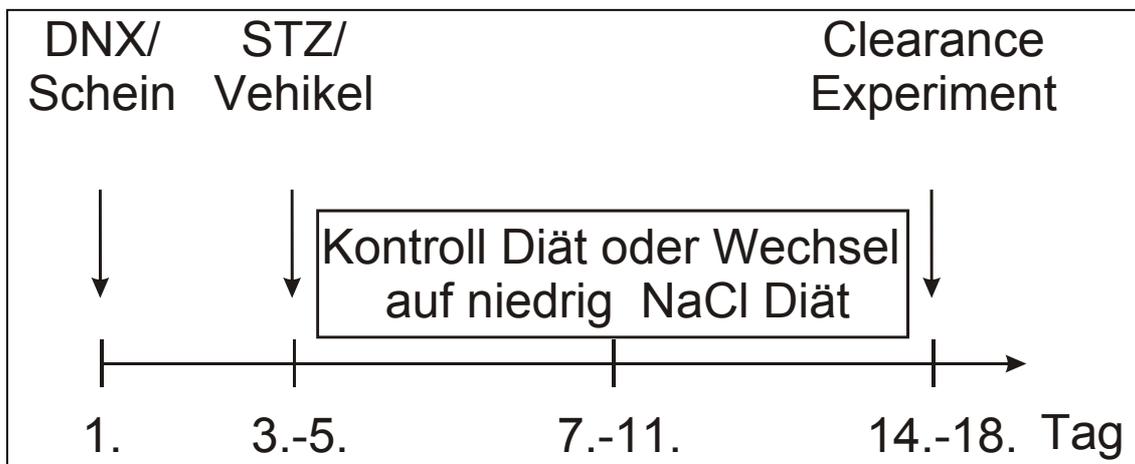


Abb. 4: Studiendesign: Scheinoperation oder Denervierung (DNX) der linken Niere der Tiere, Verabreichung von STZ oder Vehikel, Beginn der jeweiligen Diät und abschließende, terminale Experimente.

### **2.1.2 Haltungsbedingungen**

Die Experimente wurden an männlichen (60-90 Tagen alten) Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Bei Anlieferung betrug das Körpergewicht der Tiere 225-250 g, danach wurden sie für 16-22 Tage unter kontrollierten Bedingungen gehalten.

Während dieser Zeit hatten die Tiere bei einer Temperatur von 24°C und 12-Std. Hell-Dunkel-Rhythmus freien Zugang zu Standarddiät (Altromin 1320, Altromin, Lage/Lippe) oder zu NaCl-armer Diät (Altromin Sonderdiät C 1036, Altromin, Lage/Lippe) sowie zu Leitungswasser. Einmal pro Woche wurden die Ratten umgesetzt.

### **2.1.3 Induktion des Diabetes mellitus**

Die Induktion des experimentellen Diabetes mellitus erfolgte mittels intraperitonealer Gabe von Streptozotocin (STZ), einem von Streptomyces achromogenes produzierten Glukosamin (N-[methylnitroso-carbamoyl]-D-glukosamin), das bei Ratten für eine sehr rasche Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas sorgt und schon 12-24 Stunden danach zu einer Hyperglykämie führt (57).

Streptozotocin wurde in Zitratpuffer (0,210 g Zitronensäure auf 10 ml Aqua bidest, pH 4,2) gelöst und in einer Dosis von 60 mg/kg KG intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Lösung wurde jeweils kurz vor der Anwendung angesetzt. Drei Tage nach der Injektion wurde der Plasmaglukosespiegel in einem Blutstropfen aus der Schwanzspitze des Tieres mittels Teststreifen (Accu-Chek Sensor Teststreifen, Roche, Mannheim) und einem Blutzuckermessgerät (Accu-Chek Sensor, Roche, Mannheim) bestimmt. Bei einem Plasmaglukosespiegel über 300 mg/dl wurde das Tier als diabetisch angesehen.

Waren die Blutglukosewerte nach Ablauf von weiteren zwei Tagen noch im Normbereich (80-120 mg/dl) erfolgte eine zweite Injektion von STZ (40-45 mg/kg KG), deren Erfolg wiederum nach drei Tagen durch

Blutzuckerbestimmung kontrolliert wurde. Erneut nichtdiabetische Tiere wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen.

Kontrolltiere erhielten eine einmalige intraperitoneale Injektion des Zitratpuffers. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Plasmaglukosewerte nochmals bestimmt.

Behandlung diabetischer Tiere mit Insulin: Zur Verwendung kam Insulin Novo Ultralente (Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz); es zählt zu den Langzeitinsulinen mit einer maximalen Wirkdauer von 24-36 Std. Das Behandlungsziel bestand darin, extreme Blutzuckerspitzen über 400 mg/dl zu vermeiden. Die Tiere erhielten hierzu nach Bedarf maximal 4 I.E./Tag Insulin subkutan appliziert.

#### **2.1.4 Denervierung der Nieren**

Bei den Ratten (außer den Schein-Tieren) wurde eine selektive einseitige (linke) Nierendenerverung durchgeführt. Die nicht denervierte rechte Niere diente als Kontrolle und sollte die physiologische Antwort der Niere auf dargebotene Versuchsbedingungen darstellen. Die Tiere wurden nicht nüchtern gelassen, um die Blutglukosespiegel stabil zu halten und eine postoperative Hypoglykämie zu vermeiden. Um möglichst keimarme Bedingungen zu schaffen, wurde einmalig das Arbeitsgebiet und der Operationstisch mit Terralin® 0,5% (TPH 5225, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt), und vor jedem einzelnen Eingriff nochmals mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Das Instrumentarium wurde bei 180 °C für mindestens 30 Minuten sterilisiert.

Nach Bestimmung des Körpergewichtes wurden die Tiere mit einer Kombination aus Ketamin und Xylazin narkotisiert. Dabei wurden Ketamin (Ketanest®, Parke-Davis, Freiburg) in einer Dosis von 42 mg/kg KG und Xylazin (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen) in einer Dosis von 9 mg/kg KG intraperitoneal verabreicht. Das Eintreten der Narkose wurde anhand des vollständigen Verlustes des Muskeltonus, eines fehlenden Kornealreflexes und fehlender Reaktionen auf Schmerzreize festgestellt. Bei Bedarf wurden

während der Operation 20% der ursprünglichen Dosis an Narkosemittel nachinjiziert.

Für den Eingriff wurden die narkotisierten Tiere in Rückenlage auf einen vorgewärmten und per Rektalsonde thermoregulierten Präpariertisch gelegt. Nach Desinfizierung des Operationsgebietes mit Betaisodona-Lösung® (Povidon-Iod, Mundipharma, Limburg) erfolgte ein medianer Hautschnitt im Abdominalbereich. Nach Durchtrennung der Linea alba und des Peritoneums wurden die Darmschlingen vorsichtig mit kleinen atraumatischen Haken beiseitegehalten und die linke Niere dargestellt. Unter stereomikroskopischer Sicht (VMT 10x, Olympus, Japan) wurden die Nierengefäße dargestellt und die Arterie und Vene stumpf voneinander getrennt. Die Arterie wurde als Nierenarterie identifiziert, wenn bei kurzem Abklemmen eine deutliche Abblassung der Niere sichtbar wurde. Es erfolgte das Entfernen von sichtbaren größeren Nerven von der Nierenarterie. Ein Zellstoffstreifen, der zuvor mit neurotoxischer Phenollösung (10%ig in Ethanol) getränkt worden war, wurde um die Arterie geschlungen.

Nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten wurde der Zellstofftupfer entfernt, dieses Vorgehen wurde zweimal wiederholt. Nach Entfernung des letzten Tupfers wurde das Operationsgebiet mit 0,9% NaCl-Lösung ausgiebig gespült und vorsichtig ausgetupft, die Haltehaken wurden entfernt. Danach erfolgte der schichtweise Verschluss der Bauchdecken (Muskel und Faszie mit resorbierbaren Fäden Vicryl 2-0, Ethicon, Hamburg, Haut mit nichtresorbierbaren Fäden Dermafil 2-0, Dr. Ruhland, Neustadt) durch Einzelknopfnähte. Die Kontrolltiere wurden einer sogenannten Scheinoperation unterzogen: diese verlief in gleicher Weise, wobei aber keine Manipulation an den Nierengefäßen vorgenommen wurde.

Nach dem Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere für weitere zwei Stunden überwacht; um sie vor Auskühlung zu schützen, wurde eine Wärmelampe eingesetzt.

### 2.1.5 Präparation für das terminale Clearanceexperiment

Für die Narkose erhielten die Tiere 80-90 mg/kg KG Thiobutabarbital (Inactin®, Sigma, St. Louis, USA) gelöst in Aqua bidest intraperitoneal appliziert. Nach Narkoseeinleitung wurden die Ratten auf den vorgewärmten und beheizbaren Präparationstisch (RT Effenberger, München) gelegt, eine konstante Körpertemperatur (37,2°C) wurde mittels einer rektalen Sonde und servo-kontrollierter Anpassung der Tischtemperatur gewährleistet.

Nach Verlust des Muskeltonus und fehlender Reaktionen auf Schmerzreiz erfolgte zu Beginn der Präparation ein ventraler medianer Hautschnitt am Hals; zur Inzision wurde hier, wie auch bei allen folgenden Hautschnitten, das Fell mit Paraffinöl geglättet. Nach stumpfer Spaltung der infrahyalen Muskulatur und der bindegewebigen Schichten wurde die Trachea dargestellt. Um eine narkosebedingte Verlegung der Atemwege durch Zurückfallen der Zunge oder durch Sekrete zu verhindern, wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Dazu wurde die Trachea mit einem Faden distal angeschlungen, zwischen zwei Knorpelspangen quer eröffnet und ein Polyethylentubus (alle Katheter und Tuben: SIMS Portex Ltd., Hythe, UK) eingeführt, der anschließend mit dem Faden fixiert wurde. Nun wurde die rechte Vena jugularis aufgesucht und stumpf von dem sie umgebenden Bindegewebe freipräpariert. Distalwärts wurde die Blutzufuhr mit einer Fadenligatur (alle Fäden: Seidenfäden 5/0 metric 1 schwarz geflochten, Suprama, Berlin) unterbunden, die Vene herzwärts der Ligatur unter stereomikroskopischer Sicht (Leica Wild M 10, Leica Wetzlar). Zu Infusionszwecken wurde dann ein Polyethylenkatheter ca. 10 mm in die Vene eingebracht und mit Fäden fixiert.

Anschließend folgte die Darstellung der linken Arteria femoralis. Dazu wurde die Haut distal der Leistenregion mit einem Längsschnitt eröffnet, die darunterliegenden Gewebsschichten stumpf durchtrennt und mit einem kleinen atraumatischen Haken zur Seite gehalten. Darunter wurde nun die Sicht auf den Gefäß-Nerven-Strang frei. Die Arterie wurde vorsichtig in dieser Bindegewebsscheide von der Femoralvene und dem Nervus femoralis gelöst und anschließend distal ligiert. Weiter proximal wurden zwei Fäden

angeschlossen und die Arterie so stark unter Zug gesetzt, bis die Blutzufuhr zum Erliegen kam. Jetzt erfolgte ein kleiner Einschnitt in das Gefäß, der arterielle Katheter wurde unter mikroskopischer Sicht eingeführt und ca. 5-10 mm vorgeschoben. Nach Überprüfung der korrekten Lage, wurde der Zug auf die Arterie entfernt und der Katheter mit den angeschlossenen Fäden eingebunden. Der Katheter war mit einem Druckaufnehmer verbunden (TBM 4, WPI, Heidelberg), der das Signal über einen Brückenverstärker auf einen Schnellschreiber weiterleitete. So konnte der Blutdruck während des gesamten Experimentes aufgezeichnet und Blutproben entnommen werden.

Um Verschlüsse des arteriellen Katheters durch Thromben zu vermeiden, wurde dieser nach jeder Blutentnahme mit einer heparinisierten NaCl-Lösung (100 µl 5%ige Heparinlösung und 900 µl 0,9%ige NaCl-Lösung) gespült.

Zur Urinbestimmung musste die Probengewinnung seitlich getrennt aus beiden Nieren erfolgen. Dies konnte erreicht werden, indem beide Ureteren einzeln katheterisiert wurden.

Nach einem suprapubischen, transversalen Hautschnitt wurden die abdominellen Muskeln und die Faszien mitsamt dem Peritoneum durchtrennt. Dabei wurde auf sorgfältige Blutstillung geachtet. Mit kleinen Haken wurden die Darmschlingen und die Samenbläschen zur Seite gedrängt. Mit dem frei werdenden Blick auf das Retroperitoneum konnte nun auf einer Seite der Ureter an seinen kontraktile Längsbewegungen identifiziert und bis zur Einmündung in das Blasendach verfolgt werden.

Nach Eröffnung des Retroperitoneums wurden die Ureteren vorsichtig vom umgebenden Bindegewebe unter Schonung der Blutgefäße getrennt, distal mit einem Faden ligiert, aus deren Umgebung luxiert und leicht unter Zug genommen. Durch den folgenden Harnaufstau kam es zu einer Dilatation der Ureteren, die daraufhin problemlos inzidiert und ein Polyethylenkatheter eingeführt werden konnte. Die Fixation erfolgte mit einem weiteren vorgelegten Faden.

Das Tier wurde in Rückenlage belassen und der Urin für jede Niere einzeln getrennt über die eingebundenen Katheter in ein PE-Gefäß (Safe-Lock 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg) abgeleitet.

Zum Ende der Präparation wurden die Bereiche des Hals-, Bein- und Bauchschnittes mit Parafilm bedeckt, um eine Austrocknung durch Flüssigkeitsverlust zu verhindern.

### 2.1.6 Infusionslösungen

Über den venösen Katheter wurde während des gesamten Experimentes Ringerlösung (in mM: 30 NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 KCl, 111 NaCl) infundiert. Hierfür wurden 6,487 g Kochsalz (NaCl reinst, Merck, Darmstadt), 0,350 g Kaliumchlorid (Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt) und 2,520 g Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt), in einem Liter Aqua bidest gelöst. Diabetischen Tieren wurde der Lösung noch 3,6 g Glucose (20 mM) hinzugefügt, um während des gesamten Experimentes stabile Blutglucosewerte zu erhalten und eine Normoglykämie zu vermeiden. Bei allen Versuchsgruppen erhielt die Lösung außerdem [<sup>3</sup>H] markiertes Inulin (Aktivität: 100 µl Ci/dl), um mittels der Inulin-Clearance die glomeruläre Filtrationsrate bestimmen zu können. Die Infusion erfolgte mit Hilfe einer elektrischen Infusionspumpe (Perfusorpumpe Typ 871642, Braun, Melsungen) mit folgenden Flussraten, um die Flüssigkeitsverluste über den Urin auszugleichen:

Schein-KON:	3 ml/h Ringer-Lsg und initialer Bolus von 5 min 12 ml/h Ringer-Lsg
KON-DNX:	3 ml/h Ringer-Lsg und Bolus von 5 min 12 ml/h Ringer-Lsg
KON-DNX-DIÄT:	3 ml/h Ringer-Lsg und Bolus von 5 min 12 ml/h Ringer-Lsg
KON-DNX-STZ:	4 ml/h Ringer-Lsg + Glucose und Bolus von 10 min 12 ml/h Ringer-Lsg + Glucose
KON-DNX-STZ-DIÄT:	6 ml/h Ringer-Lsg + Glucose und Bolus von 10 min 12 ml/h Ringer-Lsg + Glucose

Diabetische Tiere, insbesondere unter salzarmer Diät, weisen eine deutliche Diurese auf (59) und so wurden die Infusionsraten größer gewählt, um Volumenverlusten vorzubeugen.

### **2.1.7 Zeitlicher Ablauf der Clearanceexperimente und Probenentnahme**

Der chirurgischen Präparation der Tiere, die ungefähr 60 Minuten dauerte, folgte eine 60-minütige Stabilisierungsphase, in der sich die Tiere bis zum Start der Messungen erholen und ein konstanter Urinfluss erreicht werden konnte.

Danach folgte die Urinsammelperiode, die 30 Minuten dauerte, in der Urin über jeden Ureter einzeln in Kunststoffgefäßen (s.o.) quantitativ gesammelt wurde. Jeweils in der Mitte der Versuchsperioden erfolgte die Blutentnahme (160 µl) aus dem arteriellen Katheter mittels heparinierter Glaskapillaren (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren 75 µl, Brand GmbH & CO, Wertheim). Vor und nach der Sammelperiode wurde der Blutzucker der diabetischen Tiere bestimmt.

### **2.1.8 Nierenentnahme**

Nach Abschluss der Clearanceexperimente wurde der Bauchraum der Tiere mit einem medianen Bauchschnitt weiter eröffnet und nacheinander die linke und rechte Niere dargestellt. Nach Freilegung der Nierengefäße und vorsichtigem Abpräparieren des umgebenden Fettgewebes erfolgte die proximale Ligatur der Gefäße durch einen vorgelegten Faden. Danach erfolgte die Nephrektomie, gefolgt von der sofortigen Messung des Nierenfeuchtgewichts (Feinwaage Precsia 100, Oerliko, Zürich, Schweiz). Nach der Bestimmung des Gewichtes wurden die Nieren mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Klemme auf -180 °C schockgefroren und bis zur späteren Bestimmung des Noradrenalingehaltes bei -80 °C aufbewahrt.

## **2.2 Analytik**

### **2.2.1 Urinvolumen**

Die Urinsammelgefäße der Sammelperiode wurden auf einer Präzisionswaage (s.o.) gewogen. Das zuvor ermittelte Leergewicht wurde abgezogen. Die daraus resultierende Gewichts Differenz in mg wurde als direktes Maß für das Urinvolumen in  $\mu\text{l}$  angenommen.

### **2.2.2 Hämatokrit**

Die Mikrohämatokritröhrchen mit dem entnommenen Blut der Sammelperioden wurden einseitig mit Knet verschlossen und für fünf Minuten in einer Hämatokritzentrifuge (Hettich Hämatokrit, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Nach der Bestimmung des Hämatokritwertes wurde der Plasmaüberstand abgenommen und die festen Bestandteile verworfen.

### **2.2.3 Elektrolytkonzentrationen in Plasma und Urin**

Um die Elektrolytkonzentrationen von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  zu bestimmen, wurden die Proben nach entsprechender Verdünnung mit Aqua bidest. mittels eines Flammenphotometers (ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg) untersucht. Dieses Gerät wurde vor jeder Messung mit Standardproben definierter Elektrolytkonzentrationen (Urin- bzw. Serumstandard, Eppendorf, Hamburg) kalibriert, dieser Vorgang wurde jeweils nach 20 Messungen wiederholt. Es wurden für jede Urin- bzw. Plasmaprobe zweimal  $10\ \mu\text{l}$  für die Erstellung von Doppelwerten in je 2 ml Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Als Ergebnisse dienten die Mittelwerte, die aus den Einzelwerten dieser Doppelproben gewonnen wurden.

#### **2.2.4 <sup>3</sup>H-Inulinmessung in Plasma und Urin**

Die Aktivität von <sup>3</sup>H wurde mit Hilfe eines β-Szintillations-Messgerätes (Canberra, Packard 2550) bestimmt. Dazu wurden in spezielle Probengefäße (Midi-Vial, Packard, Groningen, Niederlande) zu 10 µl der Urin- bzw. der Plasmaproben je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold®, Packard, Groningen, Niederlande) pipettiert. Der Zweck der Szintillationsflüssigkeit besteht darin, die durch den radioaktiven Zerfall von <sup>3</sup>H freiwerdende Energie in Lichtimpulse zu verwandeln. Von den Plasma- und Urinproben wurden Doppelproben angesetzt und der Mittelwert berechnet.

#### **2.2.5 Noradrenalinbestimmung im Nierenparenchym**

Um sicherzustellen, dass die Denervierung der Nieren erfolgreich durchgeführt worden war, wurde bei den Tieren nach Abschluss der Versuchsreihen der Noradrenalingehalt in den entnommenen und eingefrorenen Nieren bestimmt. Basierend auf vorhergehenden Studien galt die linke Niere als denerviert, wenn der Noradrenalingehalt im Nierengewebe weniger als 10% des Noradrenalingehaltes der rechten innervierten Niere betrug (43).

Die bei den Versuchen entnommenen und eingefrorenen Nieren wurden in Plastikröhrchen mit 2 ml eisgekühlter Sulfosalicylsäure (S-Sulfosalicylsäure-Dihydrat, 4%ig, Merck, Darmstadt) gegeben und mit Hilfe eines Mixers (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.) bei 24000 U/min homogenisiert. Das eingesetzte Gewicht der Nieren wurde als Differenz des Gewichts des Reagenzglases inklusive Sulfosalicylsäure mit und ohne Niere bestimmt. Anschließend wurde als interner Standard jedem Röhrchen 100 ng/g Nierengewicht eines DHBA-Standards (3,4-Dihydroxybenzylamin) dazugegeben. Der charakteristische DHBA-Peak im Chromatogramm machte eine quantitative Auswertung des Katecholaminpeaks möglich. Gleichzeitig wurden zwei Proben Katecholaminstandard hergestellt, denen ebenso DHBA (25 µl) hinzugefügt wurde. Danach wurden alle Röhrchen eine Stunde auf Eis

gestellt, kurz gemischt und anschließend 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (Hettich Rotanta, Hettich, Tuttlingen). Von dem Überstand jedes Röhrchens wurden Doppelproben genommen (2 x 500 µl) und in Eppendorf-Cups (Eppendorf, Hamburg) überführt. Anschließend wurde in alle Proben je 1 ml Tris-Puffer (pH 8,6) gegeben und der pH-Wert der Proben mittels pH-Meter (pH-Meter Orion Research 611, Stall) und 2 M NaOH bzw. 2 M HCl auf pH 8,6 eingestellt. Zur Adsorption der Katecholamine wurde den Proben ca. 90 mg getrocknetes Aluminiumhydroxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) zugegeben und das Ganze auf einem Vibrax-Schüttler (IKA-Vibrax-Schüttler VXR, Fa. Janke&Kunkel, Staufen i. Br.) 15 min gemischt. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert (Hettich Mikro 12-24, Hettich, Tuttlingen) und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang mit 1 ml Aqua bidest. Die Proben wurden wieder geschüttelt, abzentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. In einem zweiten Waschvorgang wurde das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mit 2 x 500 µl Aqua bidest in Extraktionssäulen überführt, kurz geschüttelt und 10 Minuten lang bei 2500 Umdrehungen/min zentrifugiert (Hettich Rotanta, Tuttlingen). Das Filtrat wurde verworfen, die abschließende Elution der Katecholamine vom  $\text{Al}_2\text{O}_3$  erfolgte durch Zugabe von 300 µl 0,1 M Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Die Proben wurden nochmals 10 Minuten geschüttelt, so dass die Katecholamine vollständig in die flüssige Phase übergehen konnten, und schließlich in der Zentrifuge bei 2500 Umdrehungen/min in spezielle HPLC-Vials überführt.

Die quantitative Katecholaminbestimmung erfolgte mit der reversed phase HPLC (high performance liquid chromatography). Dabei wurden die Proben mit den Katecholaminen in einem polaren Fließmittel (Elutionsmittel) unter hohem Druck über eine unpolare stationäre Phase (Sorptionsmittel) geleitet. Die chromatographische Trennung erfolgte nach der Molekülgröße, die getrennten Substanzen wurden an den unterschiedlichen Zeiten erkannt, mit der sie die Trennsäule durchliefen (Retentionszeiten). Nach Austritt aus der Säule wurden die Substanzen mittels eines elektrochemischen Detektors registriert. Der Katecholamingehalt der einzelnen Proben konnte dabei durch den Vergleich der einzelnen Peaks mit dem DHBA-Standard-Peak quantitativ erfasst werden.

Das verwendete HPLC-System bestand aus einem automatischen Probengeber (Gina 160, Gynkothek, München), einer reversed phase C18-Trennsäule (Nucleosil 5 µm, Grom, Herrenberg), einer Hochdruckpumpe (S 1100, Sykam, Gilching) sowie einem elektrochemischen Detektor (EP 30, Biometra, Göttingen); rechnerisch gesteuert wurde das System über die Software Axxi-Chrom 737 (Axxiom Chromatography Inc., Calabasas/USA).

## Beispiele der chromatographischen Katecholaminbestimmung

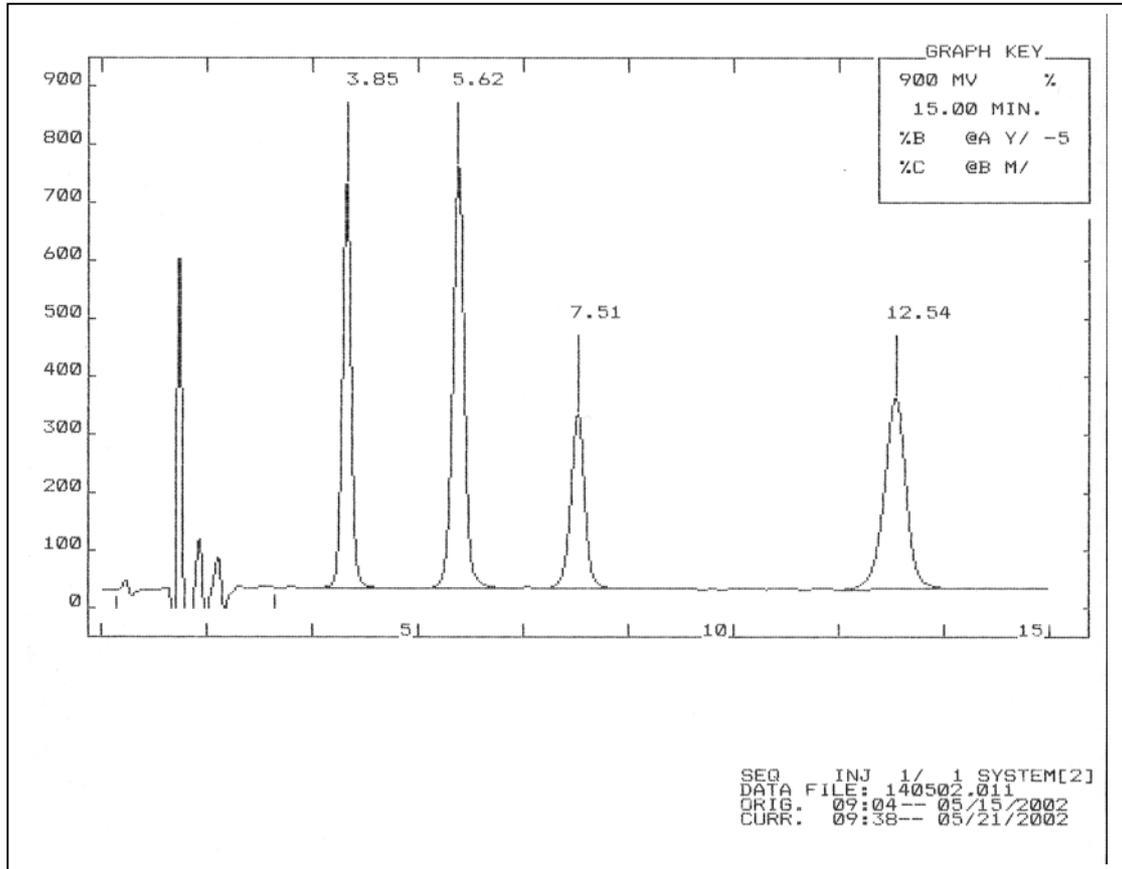


Abb. 5: Chromatographiekurve der internen Katecholaminstandards und des DHBA-Standards: Noradrenalin (3.85), Adrenalin (5.62), DHBA (7.51), Dopamin (12.54)

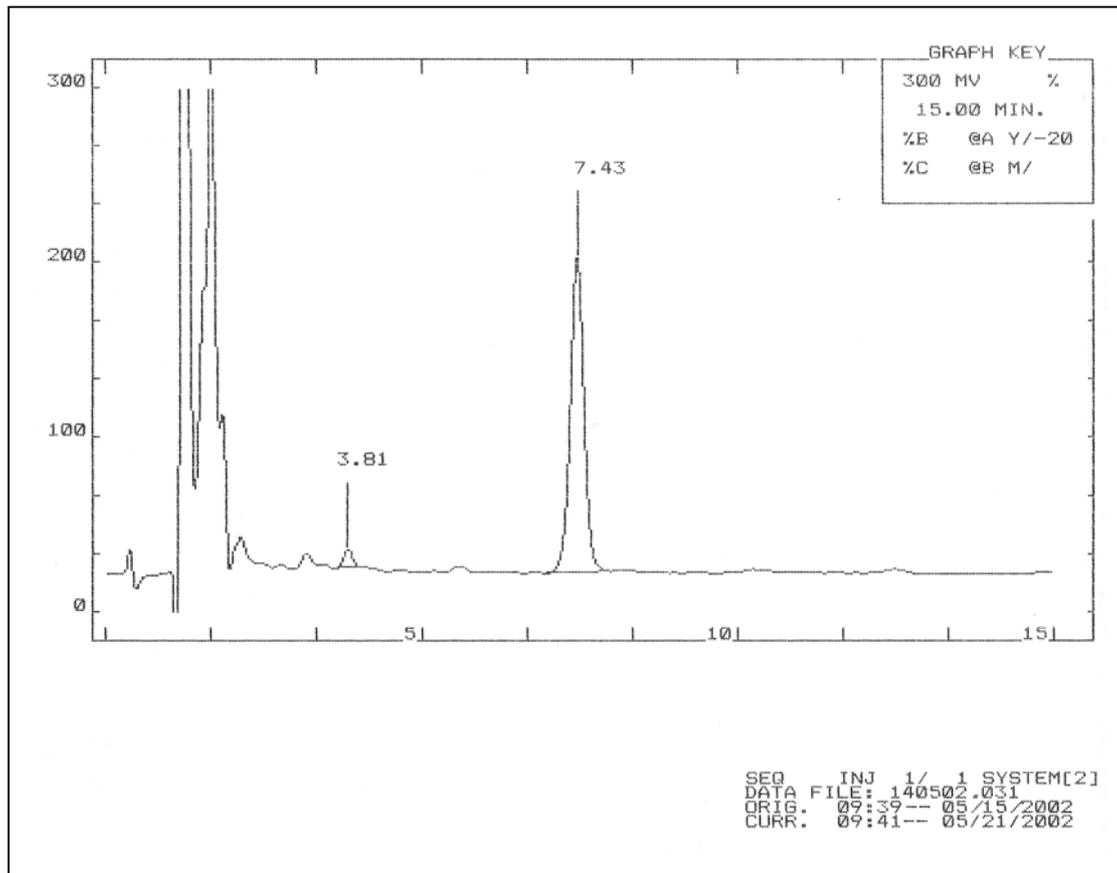


Abb. 6: Chromatographiekurve der linken denervierten Niere mit kleinem Noradrenalinpeak: Noradrenalin (3.81), DHBA (7.43)

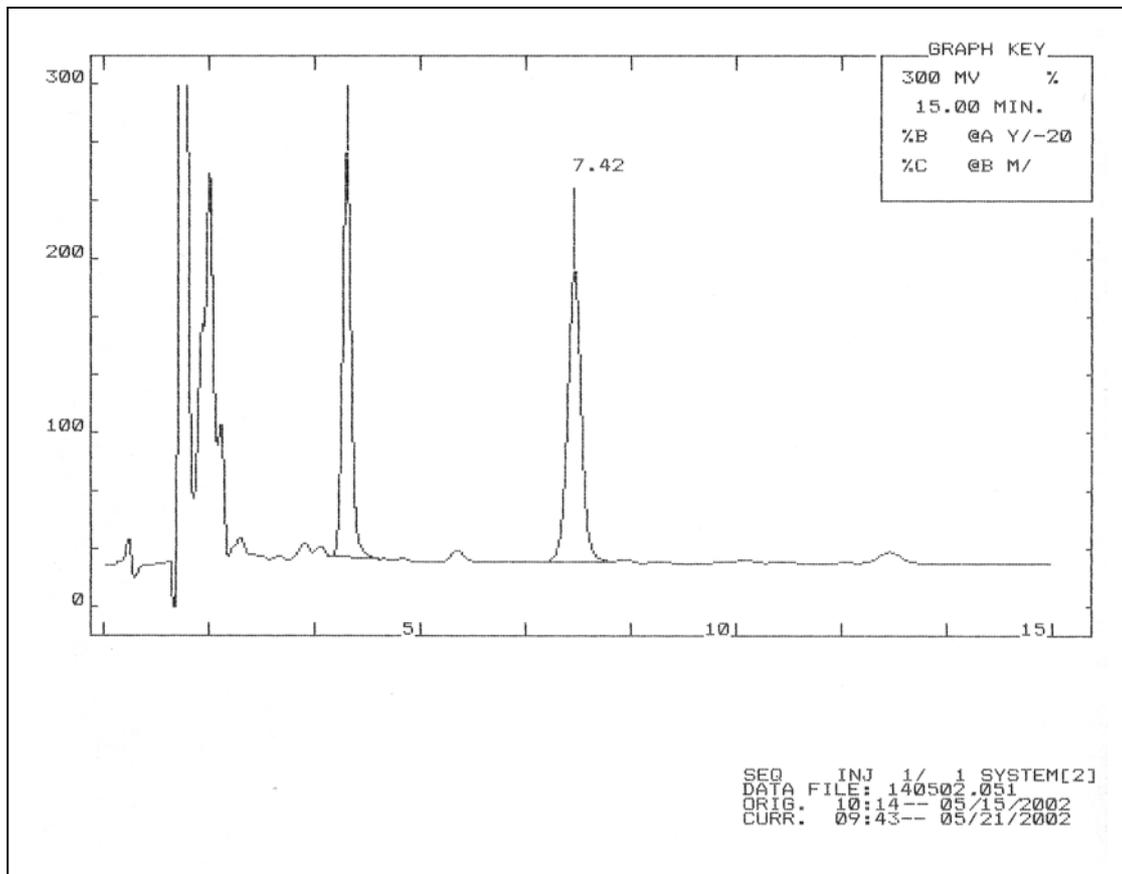


Abb. 7: Chromatographiekurve der rechten innervierten Niere mit normalem Noradrenalinpeak: Noradrenalin (3.82, Position nicht markiert; vgl. Abb. 6), DHBA (7.42)

## 2.3 Berechnungen und Statistik

### 2.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD)

Während der Sammelperiode wurden die Werte des systolischen ( $P_{\text{systol}}$ ) und des diastolischen ( $P_{\text{diastol}}$ ) Blutdruckes aus den graphischen Aufzeichnungen des Schnellschreibers ermittelt. Der mittlere arterielle Blutdruck (MABD) wurde nach folgender Näherungsformel berechnet:

$$\text{MABD} = P_{\text{diastol}} + (P_{\text{systol}} - P_{\text{diastol}}) / 3$$

### 2.3.2 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde als renale Clearance von Inulin nach folgender Standardformel berechnet:

$$\text{GFR} = [^3\text{H-Inulin}]_{\text{urin}} / [^3\text{H-Inulin}]_{\text{plasma}} \times V_{\text{urin}}$$

$[^3\text{H-Inulin}]_{\text{urin}}$  und  $[^3\text{H-Inulin}]_{\text{plasma}}$  bezeichnen die  $^3\text{H}$ -Aktivität von Plasma und Urin,  $V_{\text{urin}}$  die Urinflussrate.

### 2.3.3 Elektrolytausscheidung

Die Berechnung der absoluten Elektrolytausscheidung für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  im Urin (UNaV, UKV) erfolgte nach Bestimmung der Urinkonzentration entsprechend:

$$\text{UNaV} = [\text{Na}] \times V_{\text{urin}}$$

und

$$\text{UKV} = [\text{K}] \times V_{\text{urin}}$$

[Na] und [K] bezeichnen die flammenphotometrisch gemessene Konzentrationen von Natrium und Kalium,  $V_{\text{urin}}$  die Urinflussrate.

#### **2.3.4 Fraktionelle Natrium- und Kaliumausscheidung**

Die fraktionelle Natriumausscheidung im Urin (FR-UNaV) gibt die Natriumausscheidung in Prozent der Gesamtmenge des filtrierten Natriums an:

$$\text{FR-UNaV} = (\text{UNaV} \times 100) / ([\text{Na}]_{\text{plasma}} \times \text{GFR})$$

Entsprechend gilt für die fraktionelle Kaliumausscheidung:

$$\text{FR-UKV} = (\text{UKV} \times 100) / ([\text{K}]_{\text{plasma}} \times \text{GFR})$$

$[\text{Na}]_{\text{plasma}}$  und  $[\text{K}]_{\text{plasma}}$  bezeichnen die flammenphotometrisch gemessenen Plasmakonzentrationen von Natrium und Kalium.

#### **2.3.5 Statistische Methoden**

Es wurden die Mittelwerte der Gruppen +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Für den Vergleich der Auswirkungen einer NaCl-armen Diät auf nichtdiabetische und diabetische Tiere wurde der ungepaarte t-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Innerhalb der Gruppen wurden die Daten der linken und der rechten Niere mit dem gepaarten t-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Clearanceexperimente - Ergebnisse der einzelnen Gruppen

##### 3.1.1 Kontrolltiere (Schein-KON)

Die erste Gruppe entsprach einer Zeitkontrolle, in der die Tiere (n=10) einer Schein-Operation unterzogen wurden. Dies sollte spätere Vergleiche mit operierten linksseitig denervierten Tieren möglich machen, und unter anderem eventuelle Unterschiede der GFR zwischen der linken und rechten Niere aufdecken.

Bei Betrachtung der Messergebnisse ergaben sich folgende Werte: Körpergewicht  $362 \pm 9$  g, mittlerer arterieller Blutdruck  $113 \pm 4$  mmHg, Hämatokrit  $49 \pm 1\%$ , Plasmakonzentration Natrium  $143 \pm 1$  mM und Kalium  $4,9 \pm 0,1$  mM.

Es fanden sich keine signifikanten funktionellen Unterschiede zwischen der linken und der rechten Niere: Der Mittelwert der GFR betrug für die linke Niere  $1,50 \pm 0,06$  ml/min, und für die rechte Niere  $1,45 \pm 0,08$  ml/min (Abb. 8B). Ebenso bestanden keine Unterschiede in der fraktionellen Harnflussrate (links  $0,22 \pm 0,05\%$ , rechts  $0,29 \pm 0,07\%$ ), in der fraktionellen Natriumausscheidung (links  $0,031 \pm 0,006\%$ , rechts  $0,033 \pm 0,008\%$ ) (Abb. 9B) und in der fraktionellen Kaliumausscheidung (links  $13 \pm 3\%$ , rechts  $14 \pm 3\%$ ).

Jedoch war das Nierengewicht links mit  $1,52 \pm 0,08$  g\* etwas höher als rechts ( $1,45 \pm 0,06$  g) (Abb. 10B), auch der Noradrenalinegehalt der linken Niere war größer als der der rechten (links  $253 \pm 18$  ng/ml\*, rechts  $211 \pm 10$  ng/ml) (Abb. 11). (\*  $p < 0,05$  vs. rechte Niere)

### 3.1.2 Denervierte Tiere (KON-DNX)

Wie erwartet führte die renale Denervierung sowohl bei nichtdiabetischen und diabetischen Ratten, als auch bei normaler und NaCl-armer Diät zu einem deutlich niedrigeren Noradrenalinegehalt der linken Niere (siehe die repräsentativen Abbildungen 6 und 7 sowie Abb. 11).

Die Gruppe der denervierten Kontrolltiere (n=8) hatte folgende Ergebnisse, die ähnlich derer in der Gruppe der Schein-operierten Tiere waren: Körpergewicht  $363 \pm 3$  g, mittlerer arterieller Blutdruck  $113 \pm 4$ , Hämatokrit  $52 \pm 1\%$ , Natriumplasmakonzentration  $140 \pm 2$  mM, Kaliumplasmakonzentration  $5,1 \pm 0,2$  mM. Im Vergleich mit den Schein-operierten Tieren wies diese Gruppe jedoch etwas niedrigere Werte für die GFR auf. Bei Betrachtung der linken denervierten und der rechten innervierten Niere fand sich aber kein signifikanter Unterschied in der glomerulären Filtrationsrate (Mittelwert links  $1,24 \pm 0,09$  ml/min, rechts  $1,24 \pm 0,06$  ml/min) (Abb. 8B).

Es zeigte sich im Links-Rechts-Vergleich jedoch eine signifikante Erhöhung der fraktionellen Harnflussrate (links  $0,41 \pm 0,07\%^*$ , rechts  $0,27 \pm 0,03\%$ ) und der fraktionellen Natriumausscheidung (links  $0,045 \pm 0,012\%^*$ , rechts  $0,038 \pm 0,013\%$ ) in der denervierten Niere (Abb. 9B). Dies ist in Übereinstimmung mit einem Einfluss der renalen Nerven auf die Wasser- und Natriumreabsorption. Die fraktionelle Kaliumausscheidung betrug links  $22 \pm 5\%$ , rechts  $18 \pm 4\%$ . Wie bei den Schein-operierten nichtdiabetischen Tieren war das Gewicht der linken Niere mit  $1,53 \pm 0,04$  g\* etwas höher als das der rechten ( $1,46 \pm 0,05$  g) (Abb. 10B). Für den Noradrenalinegehalt ergaben sich folgende Werte im Sinne einer effektiven Denervierung: Linke Niere  $4 \pm 2$  ng/ml\*, rechte Niere  $148 \pm 23$  ng/ml (Abb. 11). (\*  $p < 0,05$  vs. rechte Niere)

### 3.1.3 Denervierte Tiere mit NaCl-armer Diät (KON-DNX-DIÄT)

In dieser Gruppe der Tiere mit NaCl-armer Diät (n=11) zeigten die Körperparameter zu den vorhergehenden Gruppen keinen wesentlichen Unterschied: Körpergewicht  $366 \pm 10$  g, mittlerer arterieller Blutdruck  $107 \pm 4$  mmHg, Hämatokrit  $52 \pm 1\%$ . Elektrolytkonzentrationen im Plasma: Natrium  $146 \pm 2$  mM, Kalium  $5,4 \pm 0,1$  mM. Die linke denervierte Niere zeigte im Mittelwert eine höhere GFR ( $1,41 \pm 0,06$  ml/min\*) als die rechte Niere ( $1,27 \pm 0,06$  ml/min). Keine signifikanten Unterschiede gab es bei der Betrachtung der fraktionellen Harnflussrate (links  $0,19 \pm 0,02\%$ , rechts  $0,21 \pm 0,04\%$ ), der fraktionellen Natriumausscheidung (links  $0,020 \pm 0,002\%$ , rechts  $0,020 \pm 0,002\%$ ) und des Nierengewichtes (links  $1,43 \pm 0,04$  g, rechts  $1,45 \pm 0,05$  g). Der Wert für die fraktionelle Kaliumausscheidung war links  $15 \pm 2\%^*$ , rechts  $9 \pm 1\%$ ; die Mittelwerte für die Noradrenalingehalte waren auch hier im Sinne einer effektiven renalen Denervierung unterschiedlich: Links  $8 \pm 1$  ng/ml\*, rechts  $168 \pm 16$  ng/ml. (\*  $p < 0,05$  vs. rechte Niere)

In dieser Gruppe der denervierten Tiere mit NaCl-armer Diät neigte die rechte innervierte Niere als Antwort auf die kochsalzarme Diät dazu, eine niedrigere fraktionelle Natriumausscheidung zu zeigen ( $p=0,09$ ) als die rechten Nieren der Gruppen mit normaler Standarddiät (Schein-KON, KON-DNX). In der linken Niere war die Differenz signifikant ( $p < 0,05$ ). Dies impliziert, dass kochsalzarme Bedingungen auch unter den Clearancebedingungen aufrecht erhalten werden konnten (Abb.9A).

In dieser Gruppe (KON-DNX-DIÄT) konnten damit die folgenden Unterschiede zu den Tieren mit normaler Diät (KON-DNX) beobachtet werden: i) die GFR der denervierten Niere war größer als die der rechten innervierten (Abb. 8B); ii) die fraktionelle Harnflussrate und Natriumausscheidung war in der linken denervierten Niere im Vergleich zur rechten innervierten nicht erhöht (Abb. 9B), und iii) das Gewicht der linken Niere war nicht höher als das der rechten Niere (Abb. 10B).

### 3.1.4 Diabetische denervierte Tiere (KON-DNX-STZ)

Durch die metabolischen Auswirkungen und eine starke glukosurisch bedingte Polyurie waren die Tiere in der Gruppe mit STZ-Diabetes und Denervierung unter normaler Diät (n=7) leichter (Körpergewicht  $302 \pm 7$  g) und der Blutdruck niedriger (MABD  $94 \pm 6$  mmHg) als in den anderen Gruppen. Der Blutzucker im Experiment war  $347 \pm 19$  mg/dl. Für den Hämatokrit und die Elektrolytkonzentrationen im Plasma wurden folgende Werte gemessen: Hämatokrit  $49 \pm 1\%$ , Natrium  $145 \pm 6$  mM und Kalium  $4,7 \pm 0,2$  mM. Die Auswirkungen des Diabetes mellitus, wie basale Hyperfiltration und Polyurie, war in den weiteren Messergebnissen sichtbar.

So war die glomeruläre Filtrationsrate in beiden Nieren im Vergleich zu den vorherigen Gruppen ohne STZ induzierten Diabetes erhöht (links  $1,50 \pm 0,11$  ml/min, rechts  $1,56 \pm 0,13$  ml/min) (Abb. 8A). Die fraktionelle Harnflussrate (links  $0,71 \pm 0,24\%^*$ , rechts  $0,54 \pm 0,25\%$ ) und, möglicherweise verursacht durch die vermehrte proximale tubuläre Reabsorption, das Nierengewicht (links  $1,78 \pm 0,05$  g\*, rechts  $1,65 \pm 0,07$  g) waren ebenfalls erhöht im Vergleich zu nichtdiabetischen Tieren (Abb. 10A). Im direkten Vergleich der linken denervierten und rechten innervierten Niere innerhalb dieser Gruppe fand sich, wie schon bei den nichtdiabetischen Ratten mit normaler Diät beobachtet, kein signifikanter Unterschied in der GFR (Abb. 8B), wohl aber eine größere fraktionelle Harnflussrate (links  $0,71 \pm 0,24\%^*$ , rechts  $0,54 \pm 0,25\%$ ) und eine größere fraktionelle Natriumausscheidung (links  $0,25 \pm 0,07\%$ , rechts  $0,16 \pm 0,04\%$ ) (Abb. 9B). Die fraktionelle Kaliumausscheidung betrug links  $25 \pm 6\%^*$ , rechts  $13 \pm 3\%$ , der Noradrenalingehalt in den Nieren links  $3 \pm 1$  ng/ml\*, rechts  $132 \pm 11$  ng/ml. Wie schon für die Schein-operierten Tiere und die denervierten Kontrolltiere (KON-DNX) beschrieben, war auch in dieser diabetischen Gruppe das Gewicht der linken Niere größer als das der rechten Niere (Abb. 10B).

(\*  $p < 0,05$  vs. rechte Niere)

### 3.1.5 Diabetische denervierte Tiere mit NaCl-armer Diät (KON-DNX-STZ-DIÄT)

Dieser letzten Versuchsgruppe von diabetischen denervierten Tieren (n=6) wurde NaCl-armes Futter angeboten. Wie schon in der vorherigen Gruppe wurden auch hier die Auswirkungen des Diabetes deutlich. Unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen wurden die folgenden Werte gemessen: Körpergewicht  $263 \pm 9$  g, Blutzucker  $391 \pm 9$  mg/dl, Hämatokrit  $47 \pm 1\%$ , Natriumplasmakonzentration  $153 \pm 4$  mM, Kaliumplasmakonzentration  $4,4 \pm 0,2$  mM. Die GFR betrug Werte von  $1,95 \pm 0,13$  ml/min (links) und  $1,89 \pm 0,10$  ml/min (rechts), die fraktionelle Harnflussrate  $0,92 \pm 0,14\%^*$  (links) und  $0,65 \pm 0,09\%$  (rechts), und das Nierengewicht  $1,94 \pm 0,05$  g (links) und  $1,86 \pm 0,05$  g (rechts). Die rechte innervierte Niere zeigte auch hier als Antwort auf die kochsalzarme Diät eine geringere fraktionelle Natriumausscheidung als diabetische Tiere auf Standarddiät (links  $0,13 \pm 0,05\%^*$ , rechts  $0,041 \pm 0,011\%$ ; Kaliumausscheidung links  $24 \pm 4\%^*$ , rechts  $17 \pm 3\%$ ) (Abb. 9A). Durch die renale Denervierung ergaben sich folgende Noradrenalingehalte: Für die linke Niere  $11 \pm 2$  ng/ml\*, für die rechte  $128 \pm 10$  ng/ml. (\*  $p < 0,05$  vs. rechte Niere)

Im Vergleich wies die rechte innervierte Niere der diabetischen Tiere mit kochsalzarmen Diät, übereinstimmend mit dem Salzparadoxon, eine höhere GFR ( $p=0,079$ ) und ein höheres Nierengewicht als die rechte Niere der diabetischen Tiere mit normaler Diät auf (Abb. 8A und Abb. 10A). Ein ähnlicher Effekt wurde für die linke denervierte Niere als Antwort auf die NaCl-arme Diät gefunden ( $p < 0,05$ ) (Abb. 8A und Abb. 10A). Dies impliziert, dass das Salzparadoxon bei Diabetes mellitus unabhängig von der renalen Innervierung auftritt. Im direkten Vergleich der linken denervierten mit der rechten innervierten Niere zeigten die salzarm ernährten diabetischen Tiere wie die diabetischen Tiere mit Standarddiät keinen Unterschied in der GFR der linken Niere (Abb. 8A), jedoch wies diese bei salzarm ernährten diabetischen Tieren eine größere fraktionelle Harnausscheidung und Natriumausscheidung auf (Abb. 9B).

Der Unterschied des Organgewichtes der linken denervierten gegenüber der rechten innervierten Niere, der bei diabetischen Ratten mit normaler Diät beobachtet wurde, schien bei diabetischen Tieren mit kochsalzarmem Futter schwächer auszufallen und war nicht mehr signifikant (Abb. 10B).

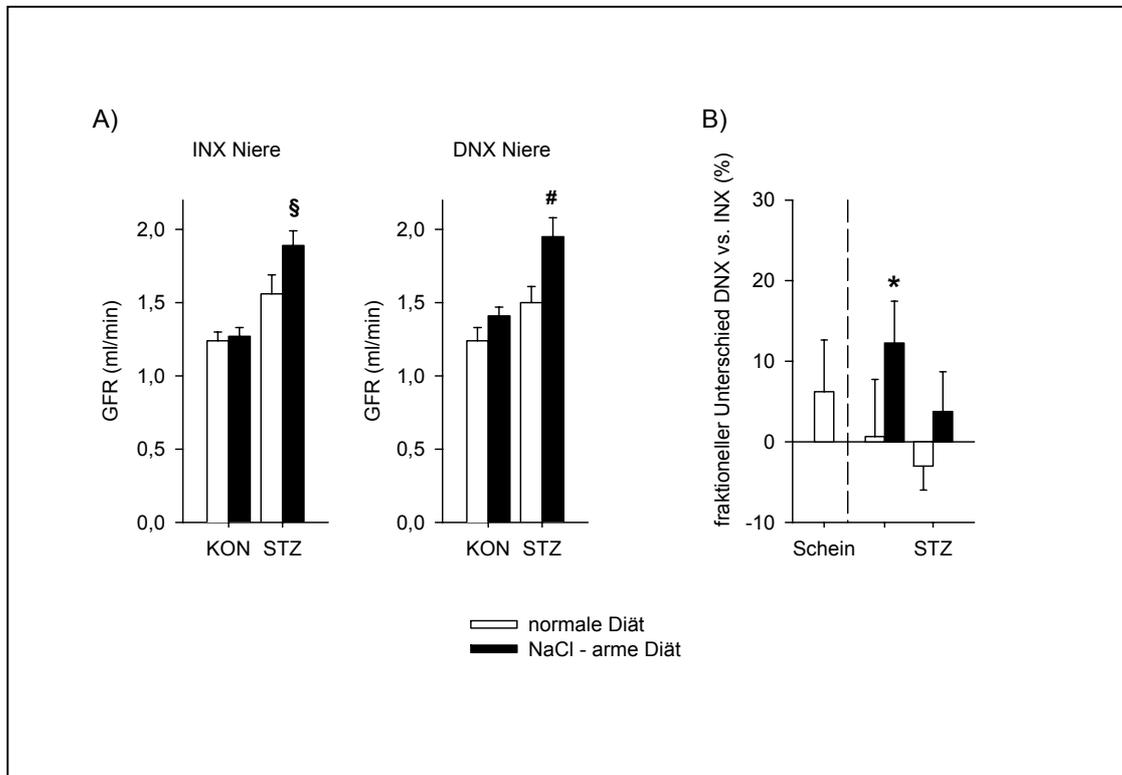


Abb. 8: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in der innervierten rechten Niere (INX) und der denervierten linken Niere (DNX) in nicht diabetischen (KON) und STZ diabetischen (STZ) Ratten unter normaler oder NaCl-armer Diät (A) und der fraktionelle Unterschied DNX vs. INX (B).

<sup>§</sup>  $p = 0,079$  vs. normale Diät; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. normale Diät; <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs. INX.

KON: nichtdiabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;

STZ: diabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;

Schein: scheinoperierte Tiere mit normaler Diät

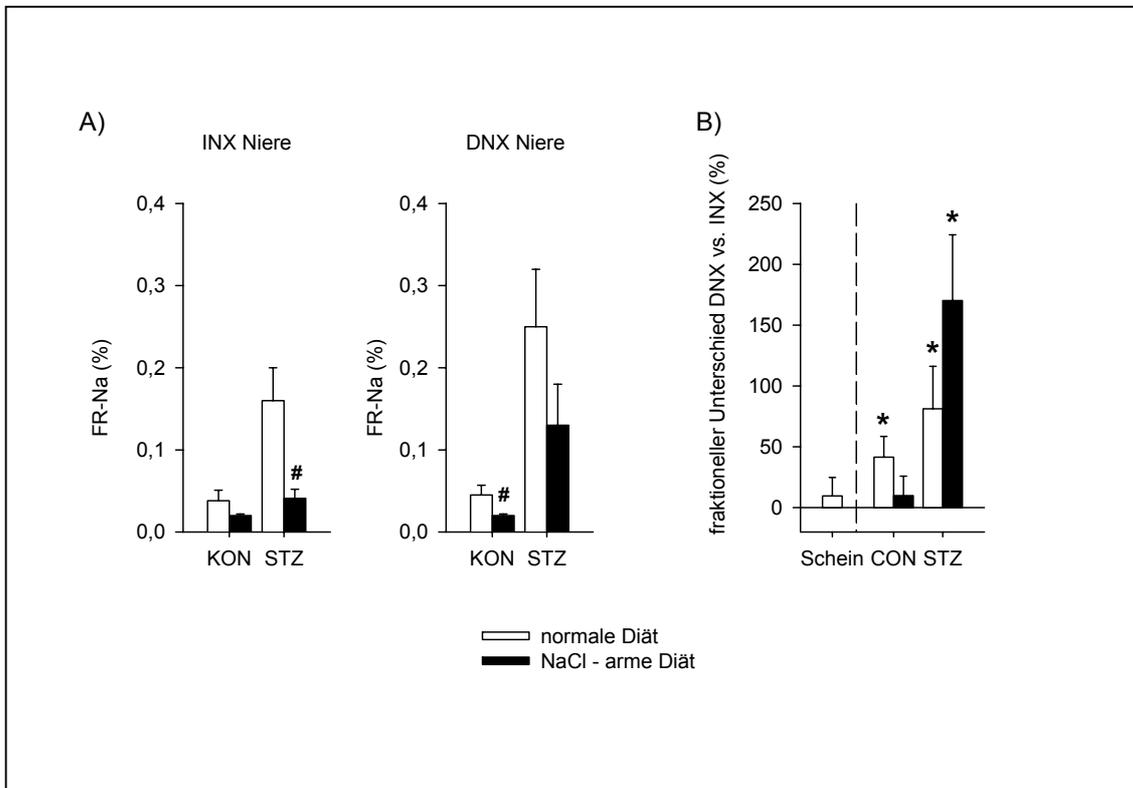


Abb. 9: Fraktionelle renale Natriumausscheidung (FR-Na) in der innervierten rechten Niere (INX) und der denervierten linken Niere (DNX) in nicht diabetischen (KON) und STZ diabetischen (STZ) Ratten unter normaler oder NaCl-armer Diät (A) und der fraktionelle Unterschied DNX vs. INX (B).

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. normaler Diät; <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs. INX.

KON: nichtdiabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;

STZ: diabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;

Schein: scheinoperierte Tiere mit normaler Diät

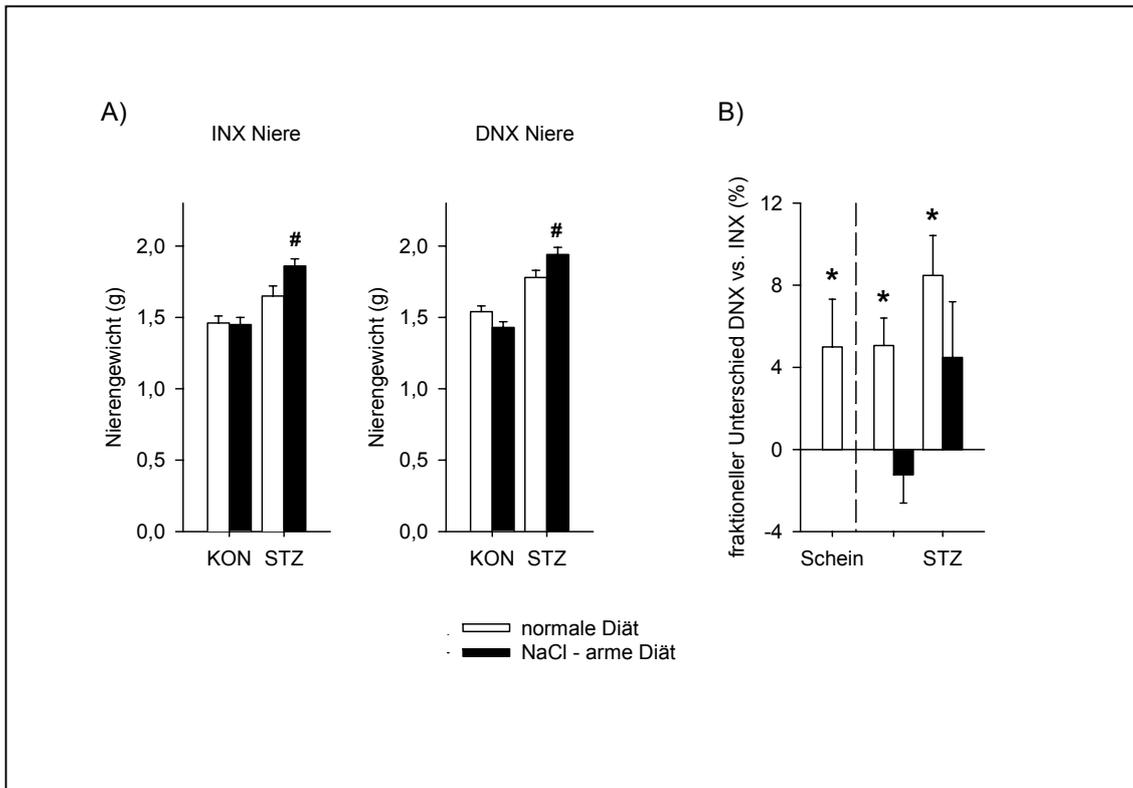


Abb. 10: Nierengewicht in der innervierten rechten Niere (INX) und der denervierten linken Niere (DNX) in nicht diabetischen (KON) und STZ diabetischen (STZ) Ratten unter normaler oder NaCl-armer Diät (A) und der fraktionelle Unterschied DNX vs. INX (B).

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs. normaler Diät; <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs. INX.

KON: nichtdiabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;

STZ: diabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;

Schein: scheinoperierte Tiere mit normaler Diät

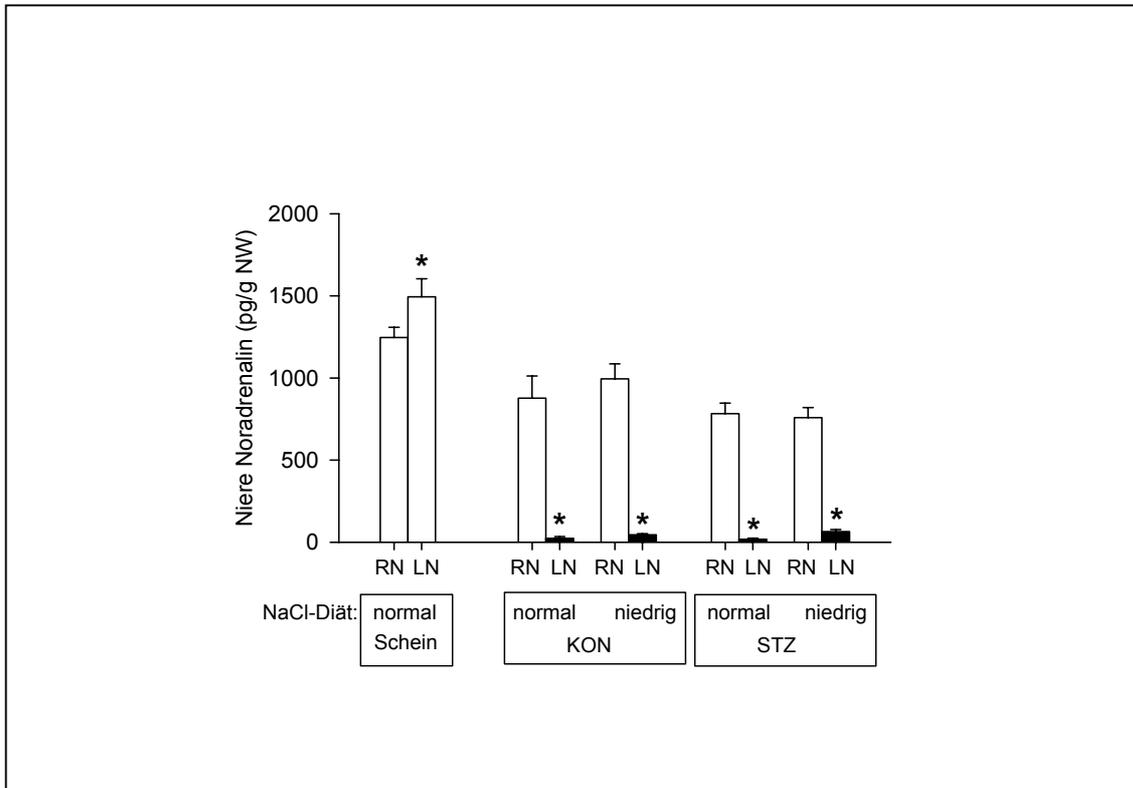


Abb. 11: Noradrenalingehalt der rechten und linken Niere (RN, LN). Schein = Schein-operierte Tiere; NG = Nierengewicht. \*  $p < 0,05$  vs. RN.  
 KON: nichtdiabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;  
 STZ: diabetische Tiere mit normaler oder NaCl-armer Diät;  
 Schein: scheinoperierte Tiere mit normaler Diät

## Zusammenfassung der systemischen und renalen Parameter

		Schein-KON (n=10)		KON-DNX (n=8)	KON-DNX-DIÄT (n=11)	KON-DNX-STZ (n=7)	KON-DNX-STZ-DIÄT (n=6)
Körpergewicht (g)		362±9		363±3	366±10	302±7	263±9 <sup>a</sup>
BGL (mg/dl)		n.g.		n.g.	n.g.	347±19	391±9
MABD (mmHg)		113±4		113±4	107±4	94±6	88±4
Hkt (%)		49±1		52±1	52±1	49±1	47±1
[Na <sup>+</sup> ]pl (mM)		143±1		140±2	146±2	145±6	153±4
[K <sup>+</sup> ]pl (mM)		4.9±0.1		5.1±0.2	5.4±0.1	4.7±0.2	4.4±0.2
GFR	RN	1.45±0.08	RN	1.24±0.06	1.27±0.06	1.56±0.13	1.89±0.10
(ml/min)	LN	1.50±0.06	LN-DNX	1.24±0.09	1.41±0.06*	1.50±0.11	1.95±0.13
UV	RN	4.0±1.0	RN	3.4±0.3	2.7±0.5	7.6±3.3	12.3±1.8
(µl/min)	LN	3.3±0.8	LN-DNX	5.0±0.8*	2.8±0.3 <sup>a</sup>	9.8±3.1*	17.8±2.6*
FR-UV	RN	0.29±0.07	RN	0.27±0.03	0.21±0.04	0.54±0.25	0.65±0.09
(%)	LN	0.22±0.05	LN-DNX	0.41±0.07*	0.19±0.02	0.71±0.24*	0.92±0.14*
UNaV	RN	64±15	RN	61±16	36±5	355±84	112±21 <sup>a</sup>
(nmol/min)	LN	65±12	LN-DNX	70±17	40±5	534±118*	337±115*
FR-UNaV	RN	0.033±0.008	RN	0.038±0.013	0.020±0.002	0.16±0.04a	0.041±0.011
(%)	LN	0.031±0.006	LN-DNX	0.045±0.012*	0.020±0.002	0.25±0.07	0.13±0.05*
FR-UKV	RN	14±3	RN	18±4	9±1	13±3	17±3
(%)	LN	13±3	LN-DNX	22±5	15±2*	25±6*	24±4*
Nierengewicht	RN	1.45±0.06	RN	1.46±0.05	1.45±0.05	1.65±0.07 <sup>a</sup>	1.86±0.05
(g)	LN	1.52±0.08*	LN-DNX	1.53±0.04*	1.43±0.04	1.78±0.05*	1.94±0.05
NA-Niere	RN	211±10	RN	148±23	168±16	132±11	128±10
(ng/ml)	LN	253±18*	LN-DNX	4±2*	8±1*	3±1*	11±2*

#### 4. Diskussion

Die diabetische Nephropathie stellt eine der wichtigsten Spätkomplikationen des Diabetes mellitus dar. Etwa 30-40% der Patienten mit Typ I-Diabetes sind ca. 10-15 Jahre nach Erstmanifestation des Diabetes davon betroffen. Die diabetische Nephropathie ist bei etwa einem Drittel der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die Ursache. Diese Zahl zeigt steigende Tendenz. Eine bundesdeutsche Erhebung ermittelte einen Anteil der Diabetiker von 42% unter den neu dialysepflichtig gewordenen Patienten (34). Typ II-Diabetiker tragen in ähnlichem Ausmaß wie Typ I-Diabetiker hierzu bei.

Das Auftreten der diabetischen Nephropathie stellt einen Wendepunkt im Leben des Diabetikers dar: Die beobachtete Proteinurie und Mikroalbuminurie erhöhen nicht nur das renale, sondern auch das kardiovaskuläre Risiko des Diabetikers (10). Nach Borch-Johnson ist die relative Mortalität des Typ I-Diabetikers mit persistierender Proteinurie je nach Lebensalter um den Faktor 30-200 höher als in der Allgemeinbevölkerung, während dieses Risiko beim nicht proteinurischen Diabetiker nur vergleichsweise gering gesteigert ist.

Diese Zahlen verdeutlichen, dass das Verstehen der Pathogenese der diabetischen Nephropathie sehr wichtig ist und ein dringender Handlungsbedarf in der Entwicklung weiterer Therapieansätze besteht.

Ein wichtiger Ansatzpunkt hierzu ist die Verminderung der glomerulären Hyperfiltration, die in der Frühphase der Erkrankung auftritt und die mit einem erhöhten Risiko für das spätere Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz assoziiert sein kann.

Unsere Vorstellung zur Erklärung der diabetischen Hyperfiltration beinhaltet ein tubulozentrisches Konzept: Die erhöhte Glukosekonzentration im Blut führt auch zur vermehrten Filtration von Glukose in der Niere, die zusammen mit Natrium durch einen  $\text{Na}^+$ /Glukose-Kotransporter im proximalen Tubulus rückresorbiert wird. Durch das folgende Absinken der  $\text{NaCl}$ -Konzentration im frühdistalen Tubulus an der Macula densa kommt es zu einer Steigerung der GFR durch den Mechanismus der tubuloglomerulären Rückkopplung (TGF). Darüberhinaus macht der Diabetes mellitus die proximal tubuläre Reabsorption

sensitiver auf Veränderungen in der Salzdiät und als Folge führt eine NaCl-arme Diät über den TGF zu einer Zunahme der GFR, eine NaCl-reiche Diät zu einer Abnahme (siehe Abb. 3). Dieses Phänomen nennen wir das Salzparadoxon. Die Natriumresorption im proximalen Tubulus ist also ein Schlüsselpunkt in der Regulation der GFR und damit der glomerulären Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus. Da Veränderungen der efferenten renalen sympathischen Nervenaktivität (ERSNA) den Salztransport im proximalen Tubulus beeinflussen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Nierenerven für das Salzparadoxon genauer untersucht.

#### **4.1 Versuchsbedingungen**

Es wurden Clearanceexperimente zur Bestimmung der GFR an narkotisierten diabetischen und nichtdiabetischen Ratten durchgeführt. Die einzelnen Präparationsschritte und die experimentelle Umsetzung der Versuche erfolgten immer nach einem fest determinierten Schema. Die kontinuierliche Überwachung von Körpertemperatur, Blutdruck und Infusionstherapie sorgten für eine gute Vergleichbarkeit innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen. Eine Äquilibrationsphase von etwa einer Stunde nach Abschluss der Präparation sorgte in den Clearanceexperimenten für stabile Versuchsbedingungen. Geringe intraindividuelle Unterschiede der Werte sind dabei auf die natürliche biologische Variabilität und die Reaktion auf Narkose und den chirurgischen Eingriff zurückzuführen. Für die Betrachtung der Einflussnahme renaler Nerven auf die GFR wurde bei allen Gruppen, außer den Schein-Tieren, die linke Niere denerviert; zur Untersuchung des Salzparadoxons wurden Gruppen mit kochsalzreicher Diät untersucht.

#### **4.2 Effekte der renalen Denervierung auf das Salzparadoxon**

Die Hauptaussage dieser Arbeit ist, dass das Salzparadox, d.h. ein Anstieg der GFR als Antwort auf eine NaCl-arme Diät, unabhängig von der renalen

Innervierung auftritt. Zugleich war das Nierengewicht diabetischer Ratten unter kochsalzreicher Diät höher, unabhängig davon, ob die Nieren innerviert waren oder nicht. Zusammen mit einer vorherigen Studie, in der die Auswirkungen des AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan auf das Salzparadox untersucht wurde (59), zeigen diese Ergebnisse, dass weder die renale Denervierung noch die Blockade von Angiotensin II AT-1-Rezeptoren das Salzparadox in der Frühphase des Diabetes mellitus verhindern. Somit scheint die erhöhte Sensitivität der proximalen tubulären Salzreabsorption, die verantwortlich für das Salzparadox ist (65), unabhängig von den renalen Nerven und der Aktivierung des Angiotensin II AT-1-Rezeptors zu sein.

Die vorliegende Arbeit zeigte auch, dass nach ungefähr zweiwöchiger renaler Denervierung die denervierte Niere keine Unterschiede in der GFR aufweist. Jedoch war die Harnflussrate und die  $\text{Na}^+$ -Retention noch immer leicht reduziert, was daraufhin deuten könnte, dass die Auswirkungen der renalen Denervierung auf den Harnfluss und die  $\text{Na}^+$ -Reabsorption zu diesem Zeitpunkt noch nicht voll kompensiert waren. Eine Ausnahme hierzu bildete die denervierte Niere der nichtdiabetischen Ratten mit kochsalzreicher Diät. Verglichen mit der rechten innervierten Niere zeigten diese Nieren eine höhere GFR und hatten keine reduzierte Harnflussrate und  $\text{Na}^+$ -Retention. Dieser fehlende Unterschied bezüglich der Harnflussrate und der  $\text{Na}^+$ -Retention zwischen denervierter und innervierter Niere bedeutet, dass nach zwei Wochen renaler Denervierung andere Mechanismen als die Nierenerven dominieren, um die renale Salzretention als Antwort auf die salzreiche Diät zu regulieren. Diese Mechanismen beinhalten sehr wahrscheinlich die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (24). Die gegenwärtigen Ergebnisse stimmen mit einer früheren Studie an wachen Hunden mit Spaltblasen überein, in der die  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung der denervierten gegenüber der innervierten Niere während einer Niedrig-Salzdiet von neun Tagen auch nicht unterschiedlich war. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Nierenerven keine Hauptrolle in der Vermittlung der  $\text{Na}^+$ -sparenden Effekte von Angiotensin II unter chronischer Salzrestriktion spielen (40). Eine Sorge war, dass die einseitige Denervierung über die Zeit die Ansprechbarkeit der Niere auf das Plasma-Noradrenalin

erhöhen und dies den Effekt der renalen Nerven maskieren könnte. Eine kürzlich veröffentlichte Studie klärte jedoch dieses Problem; in dieser wurde gezeigt, dass chronische Denervierung nicht zu einer erhöhten Ansprechbarkeit der Niere auf Phenylephrin führt und das Modell der einseitigen Nierendennervierung ein gültiges Modell ist, um die Rolle der Nierennerven in der Regulation der renalen Funktion zu untersuchen (47). In Übereinstimmung dazu wurden ebenso narkotisierte und wache Ratten nach beidseitiger Sympathektomie mit erfolgreicher Aufrechterhaltung der  $\text{Na}^+$ -Balance als Antwort auf eine Niedrig-Salzdiät beobachtet (5, 20).

Im Vergleich zu den nichtdiabetischen Ratten blieb bei den diabetischen Tieren eine verminderte Retention von Wasser und  $\text{Na}^+$  der denervierten Niere auch unter kochsalzreicher Diät evident. Dies bedeutet, dass die renalen Nerven unter diesen Bedingungen zur Flüssigkeits- und  $\text{Na}^+$ -Retention beitragen. Da das Salzparadox auch in diesen Tieren vorhanden war, lässt sich darüber spekulieren, dass der Einfluss der renalen Nerven vorwiegend stromabwärts der Macula densa lokalisiert ist. Als eine Konsequenz aus dem Anstieg der GFR bei der Antwort auf die kochsalzarme Diät müssen die diabetischen Ratten ihre absolute Salzreabsorption in einem größeren Ausmaß erhöhen als die nichtdiabetischen Tiere, die keine Veränderung im filtrierten Salzgehalt zeigen. Dies könnte die Notwendigkeit zur vermehrten Aktivierung der renalen sympathischen Nervenaktivität der diabetischen im Vergleich zu den nichtdiabetischen Tieren als Antwort auf eine kochsalzarme Diät erklären.

Die oben erwähnte höhere GFR der denervierten versus der innervierten Niere bei nichtdiabetischen Ratten unter  $\text{NaCl}$ -armer Diät lässt sich schwerer interpretieren und verstehen und so können wir nur spekulieren. Es scheint, als sei die vaskuläre Antwort auf eine kochsalzarme Diät, die Auswirkungen auf die afferente und efferente Arteriole beinhalten kann, in der denervierten Niere gestört. Es ist bekannt, dass chronischer  $\text{Na}^+$ -Verlust das RAAS aktiviert, welches die renale  $\text{Na}^+$ -Retention stimuliert (24), aber gleichfalls auch die efferente Arteriole konstringiert (22). Die Angiotensin II-vermittelte Konstriktion der efferenten Arteriole wird bedeutsam für die Konstanthaltung der GFR, wenn  $\text{Na}^+$ -Entzug den renalen Perfusionsdruck reduziert. Neben der efferenten

Arteriole kann Angiotensin II auch die afferente Arteriole konstringieren (12). Ferner erfordert die Angiotensin II-vermittelte afferente arterioläre Vasokonstriktion die Mitaktivierung von Adenosin A1-Rezeptoren (23, 70) und es wurde gezeigt, dass die renale Nervenstimulation die renale Adenosinfreisetzung fördert (39). Weiterhin ist Angiotensin II für eine präjunktionale Aktivierung der Angiotensin II-Rezeptoren bekannt, die die Freisetzung von renalem Noradrenalin erleichtert (49, 73), und die Angiotensin II-induzierte renale Vasokonstriktion basiert zum Teil auf intakten renalen Nerven (14). Bei Betrachtung dieser Wechselwirkungen kann man vermuten, dass die denervierte Niere weniger sensitiv auf die durch die kochsalzarme Diät- bzw. Angiotensin II-vermittelte Konstriktion der afferenten Arteriole reagiert, was angesichts der intakten efferenten arteriolären Konstriktion in einem größeren effektiven Filtrationsdruck und somit einer größeren GFR in der denervierten versus der innervierten Niere resultieren könnte. Interessant in dieser Hinsicht ist auch, dass Saralasin, ein unselektiver Angiotensin II-Antagonist, unter bestimmten Bedingungen eine agonistische renale vasokonstriktorische Antwort induzieren kann. Diese renale vasokonstriktorische Wirkung ist mit einem Anstieg der Plasma-Noradrenalin-Konzentrationen verbunden (71). Während diese Antwort bei Menschen und Hunden mit innervierten Nieren beobachtet werden konnte, verursacht Saralasin in der denervierten Hundeniere eine Vasodilatation (71). Dieses Beispiel veranschaulicht, dass ein gegebener Stimulus in der Anwesenheit von Nierennerven eine renale Vasokonstriktion ausüben kann, bei Abwesenheit jedoch eine renale Vasodilatation. Bemerkenswerterweise zeigte die diabetische Niere unter kochsalzarmen Diät nicht das Phänomen einer größeren GFR in der denervierten Niere. Weitere Studien sind erforderlich, um diesen Sachverhalt zu klären.

Ein anderes konsistentes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war, dass ungeachtet der renalen Innervation die linke Niere bei Ratten mit normaler Diät ein etwas größeres Gewicht hatte als die rechte Niere. Da die Ratten in der Zeit zwischen Denervierung und Bestimmung des Nierengewichtes weiterwuchsen (bei den nichtdiabetischen Ratten stieg das Körpergewicht von ungefähr 240 g

auf 360 g) stimmt dies mit der Vorstellung überein, dass das normale Nierenwachstum von erwachsenen Ratten keine intakten Nerven erfordert. Erneut bildete auch diesbezüglich die denervierte linke Niere der nichtdiabetischen Ratten mit NaCl-armer Diät eine Ausnahme, deren Gewicht sich nicht von dem der innervierten rechten Niere unterschied. Wie oben schon ausgeführt, kann dieser Effekt nicht allein durch die renale Denervierung erklärt werden. Ferner kann eine kochsalzarme Diät nicht selbst diese Ergebnisse erklären, wie es die Tatsache nahelegt, dass das Gewicht der rechten innervierten Niere bei Ratten mit kochsalzarmer und normaler Diät im Grunde identisch war. Daher scheint es die Kombination aus renaler Denervierung und kochsalzarmer Diät zu sein, die das Ansteigen des Nierengewichtes vermindert. Interessanterweise schien der angesprochene Unterschied des Organgewichtes der linken denervierten versus der rechten innervierten Niere, der auch bei diabetischen Ratten mit normaler Diät beobachtet werden konnte, bei diabetischen Ratten mit kochsalzarmer Diät abgeschwächt zu sein und dies erinnert an die beschriebenen Veränderungen in den nichtdiabetischen Tieren. Zusammengefasst beschreibt diese Studie, dass die Nierenerven für das Salzparadox der diabetischen Niere nicht erforderlich sind. Ferner implizieren die Ergebnisse, dass die Nierenerven bei nichtdiabetischen Ratten nicht zur  $\text{Na}^+$ -Retention unter diätetischer NaCl-Restriktion beitragen, aber die renale Hämodynamik und das Nierengewicht unter diesen Bedingungen modulieren.

### **4.3 Therapeutische Optionen**

Patienten mit dem metabolischen Syndrom, Diabetes Typ II oder chronischer Nierenerkrankung weisen oft einen Salz-sensitiven Blutdruck auf. Ferner kann eine gesteigerte Salzzufuhr sowohl die antihypertensiven als auch die antiproteinurischen Wirkungen von Medikamenten, die das RAAS blockieren, hemmen. Hieraus folgt, dass eine moderate Anpassung der Salzzufuhr entsprechend dem Salzparadoxon, zur Verminderung der diabetischen glomerulären Hyperfiltration insbesondere in der Frühphase der Erkrankung relevant sein könnte, d.h. bevor arterielle Hypertonie und Proteinurie auftreten.

Wenn jedoch das Salzparadoxon auch bei diabetischen Patienten mit Hypertonie und Proteinurie auftritt, dann könnten Strategien wünschenswert sein, die das Salzparadoxon selbst verhindern. Deshalb kann es von klinischer Relevanz sein, wie aktuelle und neue therapeutische Strategien das Salzparadoxon beim Diabetes beeinflussen. Die aktuelle diätetische Empfehlung der American Diabetes Association ist, die Salzzufuhr bei diabetischen Patienten zu beschränken (3).

Zusätzlich zur Normalisierung der Blutdruckwerte bilden die pharmakologische Inhibition des ACE und/oder Blockade der Angiotensin AT-1-Rezeptoren einen wichtigen Eckstein in der Behandlung der diabetischen Nephropathie. Diese Methode vermindert die glomeruläre Proteinfiltration durch Senkung des Blutdrucks, aber auch durch Verhinderung pathologischer Veränderungen in der glomerulären Membran auf der einen Seite und durch Einflussnahme auf die renale Hämodynamik auf der anderen Seite. Da Angiotensin II die Reabsorption im proximalen Tubulus über AT-1-Rezeptoren stimuliert, kann diese verstärkte Reabsorption zur glomerulären Hyperfiltration beim Diabetes mellitus beitragen. ACE-Hemmer oder AT-1-Antagonisten könnten diese Reabsorption positiv beeinflussen und zur Renoprotektion beitragen (61).

In Früh-STZ-diabetischen Ratten verstärkte der AT-1-Antagonist Losartan jedoch die renale Vasodilatation und das Nierenwachstum als Antwort auf eine natriumarme Diät (59). Diese Ergebnisse unterstützen die Meinung, dass eine Hemmung des RAAS nicht das Salzparadoxon verhindert.

Während der Effekt der Diuretika auf das Salzparadoxon nicht bekannt ist, beeinträchtigt die pharmakologische Blockade der  $\beta$ -Adrenozeptoren das Salzparadoxon vermutlich nicht. Dies würde zumindest die vorliegende Untersuchung mit renaler Denervierung indizieren.

## 5. Zusammenfassung

Eine Zunahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des Nierengewichts bei Ratten und Patienten in der Frühphase des Diabetes mellitus Typ I sind Risikofaktoren für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie. Ferner verhalten sich diese beiden Parameter paradox, d.h. invers zur Salzzufuhr. Eine kochsalzarme Diät führt so zur Zunahme der GFR und des Nierengewichts. Dieses diabetische Salzparadoxon wird durch eine erhöhte Sensitivität der proximal tubulären Reabsorption gegenüber der Kochsalzdiät und den Aktionen des tubuloglomerulären Feedbacks (TGF) verursacht. Ziel dieser Studie an Ratten mit Streptozotocin (STZ)-induziertem Diabetes mellitus war die Abschätzung der Bedeutung der Nierenerven hierbei. Hierzu wurde die linke Niere in einer Kurznarkose denerviert (DNX; durch Katecholaminbestimmung in der Niere am Ende des Experiments verifiziert) bzw. in der Kontrollgruppe scheinoperiert. Nach 3-4 Tagen wurde STZ oder ein Vehikel (KON) appliziert und anschließend die normale Diät fortgeführt oder eine NaCl-arme Diät initiiert. Weitere 10 Tage später wurden unter terminaler Narkose die GFR seitengetreunt mittels Inulin-clearance und Katheterisierung der Ureteren sowie die Nierengewichte bestimmt.

Bei den diabetischen Tieren mit NaCl-arter Diät wies die rechte innervierte Niere übereinstimmend mit dem Salzparadoxon eine höhere GFR und ein höheres Nierengewicht als die rechte Niere der diabetischen Tiere mit normaler Diät auf. Die linke denervierte Niere der diabetischen Tiere zeigte ähnliche Wirkungen einer NaCl-armen Diät auf GFR und Nierengewicht. Daraus ergibt sich, dass das Salzparadoxon bei Diabetes mellitus unabhängig von der renalen Innervierung auftritt. Nichtdiabetische Ratten mit NaCl-arter Diät zeigten im Vergleich zu den Tieren mit normaler Diät weder in der innervierten noch in der denervierten Niere einen signifikanten Unterschied in der GFR oder dem Nierengewicht. Ein gepaarter Vergleich der innervierten und denervierten Niere ergab jedoch, dass eine NaCl-arme Diät bei nichtdiabetischen Ratten eine größere GFR in der denervierten im Vergleich zur innervierten Niere zur Folge hatte.

Wie erwartet führte die akute Denervierung der linken Niere bei den Tieren im Vergleich zur rechten Niere zu einer gesteigerten Harn- und Natriumausscheidung. Einzige Ausnahme in den Gruppen waren die nichtdiabetischen Tiere mit NaCl-armer Diät, deren fraktionelle Harnflussrate und Natriumausscheidung in der denervierten Niere im Vergleich zur rechten Niere nicht erhöht war.

Ungeachtet der renalen Innervation wies die linke Niere bei Ratten mit normaler Diät ein etwas größeres Gewicht auf als die rechte Niere. Dies stimmt mit der Vorstellung überein, dass das normale Nierenwachstum von erwachsenen Ratten keine intakten Nieren erfordert. Eine Ausnahme war wiederum die denervierte Niere der nichtdiabetischen Ratten unter kochsalzreicher Diät, deren Gewicht sich nicht von dem der rechten innervierten Niere unterschied.

Zusammengefasst beschreibt diese Studie, dass das Salzparadoxon, d.h. ein Anstieg der GFR als Antwort auf eine NaCl-arme Diät, unabhängig von der renalen Innervation auftritt und so die Nierenerven für das Salzparadoxon der diabetischen Niere nicht erforderlich sind. Ferner implizieren die Ergebnisse, dass die Nierenerven bei nichtdiabetischen Ratten nicht zur  $\text{Na}^+$ -Retention unter diätetischer NaCl-Restriktion beitragen, aber die renale Hämodynamik und das Nierengewicht unter diesen Bedingungen modulieren.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Abbate M, Remuzzi G: Proteinuria as a mediator of tubulointerstitial injury. *Kidney Blood Press Res* 1999; 22: 37-46
- (2) Abbate M, Zoja C, Corra D et al.: In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1213-1224
- (3) American Diabetes Association. Position Statement: Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21: S32-S35
- (4) Bank N, Aynedjian HS: Progressive increases in luminal glucose stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 1990; 86: 309-316
- (5) Bencsath P, Fekete MI, Kanyicska B, Szenasi G, Takacs L: Renal excretion of sodium after bilateral renal sympathectomy in the anaesthetized and conscious rat. *J Physiol* 1982; 331: 443-450
- (6) Bencsath P, Szenasi G, Takacs L: Water and electrolyte transport in Henle's loop and distal tubule after renal sympathectomy in the rat. *Am J Physiol* 1985; 249: F308-F314
- (7) Berger W, Gries FA, Koschinski T, Toeller M (1987) Diabetes mellitus, S1121-1144. In: Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD; *Lehrbuch der Inneren Medizin* (2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York)
- (8) Birk C, Richter K, Huang DY, Piesch C, Luippold G, Vallon V: The salt paradox of the early diabetic kidney is independent of renal innervation. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26: 344-350
- (9) Bohle A, Mackensen Haen S, von Gise H et al.: The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerulopathies: a morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 135-144
- (10) Borch-Johnsen K, Kreiner S: Proteinuria: value as predictor of cardiovascular mortality in insulin-dependent diabetes mellitus. *Brit Med J* 1987; 294 1651
- (11) Brochner Mortensen J, Stockel M, Sorensen PJ et al.: Proximal glomerulotubular balance in patients with type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1984; 27: 189-192
- (12) Carmines PK, Morrison TK, Navar LG: Angiotensin II effects on microvascular diameters of in vitro blood-perfused juxtamedullary nephrons. *Am J Physiol* 1986; 251: F610-F618
- (13) Carney SL, Wong NLM, Dirks JH: Acute effects of streptozotocin diabetes on rat renal function. *J Lab Clin Med* June 1979; 93: 950-961
- (14) Chen K, Zimmerman BG: Angiotensin II-mediated renal vasoconstriction amenable to alpha 1-adrenoceptor blockade. *Eur J Pharmacol* 1995; 284: 281-288
- (15) Chiarelli F, Verrotti A, Morgese G: Glomerular hyperfiltration increases the risk of developing microalbumuria in diabetic children. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 154-158

- (16) D'Amico G, Ferrario F, Rastaldi MP: Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 124-132
- (17) Deckert T, Feld-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kolfold-Enevoldsen A: Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989; 32: 219-226
- (18) Di Bona GF, Kopp UC: Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997; 77: 75-197
- (19) Di Bona GF: Nervous kidney: Interaction between renal sympathetic nerves and renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000; 96: 1083-1088
- (19) Eddy AA, Schnaper HW: The nephrotic syndrome: from the simple to the complex. *Semin Nephrol* 1998; 18: 304-316
- (20) Fernandez-Repollet E, Silva-Netto CR, Colindres RE, Gottschalk CW: Role of renal nerves in maintaining sodium balance in unrestrained conscious rats. *Am J Physiol* 1985; 249: F819-F826
- (21) Girchev R, Markova P, Vuchidolova V: Influence of nonselective Eta/Etb receptor blockade on renal function in conscious rats: Effects of renal denervation. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55, 22: 381-389
- (22) Hall JE, Guyton AC, Jackson TE, Coleman TG, Lohmeier TE, Trippodoo NC: Control of glomerular filtration rate by renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1977; 233: F366-F372
- (23) Hall JE, Granger JP: Adenosine alters glomerular filtration control by angiotensin II. *Am J Physiol* 1986; 250: F917-F923
- (24) Hall JE, Guyton AC, Smith MJ Jr, Coleman TG: Chronic blockade of angiotensin II formation during sodium deprivation. *Am J Physiol* 1979; 237: F424-F432
- (25) Hannedouche TP, Delgado AG, Gnoinsah DA et al: Renal hemodynamics and segmental tubular sodium reabsorption in early type 1 diabetes. *Kidney Int* 1990; 37: 1126-1133
- (26) Holmer S, Rinne B, Eckard KU et al: Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 266: F738-F745
- (27) Hostetter TH (1991). Diabetic nephropathy, Kap. 34, S.1695-1726 In: Brenner und Rector *The kidney. Physiology and pathophysiology* (4.Aufl., WB Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia, London, Montreal, Sydney, Tokyo)
- (28) Jarecki M, Thoren PN, Donald DE: Release of renin by carotid baroreflex in anaesthetized dogs. Role of cardiopulmonary vagal afferents and renal arterial pressure. *Circ Res* 1978; 42: 614-619
- (29) Jip JW, Jones SL, Wiseman MJ et al: Glomerular hyperfiltration in the prediction of nephropathy in IDDM. A 10-year follow-up study. *Diabetes* 1996; 45: 1729-1733
- (30) King H, Aubert RE, Herman WH: Global burden of diabetes 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431
- (31) Krautzig S (2001). Nicht-entzündliche Glomerulopathien, S.880-882 In: Renz-Polster H, Braun J *Basislehrbuch Innere Medizin kompakt-greifbar-verständlich* (2. Aufl., Urban&Fischer Verlag München, Jena)

- (32) Lane PH, Mauer M, Steffes MW: Renal pathology in insulin dependent and non insulin dependent diabetes mellitus. S.1342-1350 In: Michinobu Halano: Nephrology Band 2 (3. Aufl., Springer Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, Paris, Hong Kong, Barcelona)
- (33) Lervang HH, Jensen S, Brochner-Mortensen J, Ditzel J: Does increased glomerular filtration rate or disturbed tubular function early in the course of childhood type 1 diabetes predict the development of nephropathy? *Diabet Med* 1992; 9: 635-640
- (34) Lippert J, Ritz E, Schwarzbeck A, Schneider P: The rising tide of endstage renal failure from diabetic nephropathy type II – an epidemiological analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 462-467
- (35) Luik PT, Hoogenberg K, Van Der Kleij FG et al: Short-term moderate sodium restriction induces relative hyperfiltration in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45: 535-541
- (36) Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN et al.: Structural functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984; 74: 1143-1155
- (37) Meyer TW (1991): The Proteinuric phase of diabetic nephropathy. S.1351-1361 In: Michinobu Halano: Nephrology Band 2 (3. Aufl., Springer Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, Paris, Hong Kong, Barcelona)
- (38) Miller JA: Renal response to sodium restriction in patients with early diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 749-755
- (39) Mi Z, Jackson EK: Effects of alpha- and beta-adrenoceptor blockade on purine secretion induced by sympathetic nerve stimulation in the rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 295-301
- (40) Mizelle HL, Hall JE, Woods LL: Interactions between angiotensin II and renal nerves during chronic sodium deprivation. *Am J Physiol* 1988; 255: F823-F827
- (41) Mogensen CE, Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *Engl J Med* 1984; 311: 89-93
- (42) Mogensen CE: Early glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetics and late nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46: 201-206
- (43) Mühlbauer B, Osswald H: Feeding-induced increase in urinary dopamine excretion is independent of renal innervation and sodium intake. *Am J Physiol* 1994; 266: F563-F567
- (44) Österby R, Gundersen HJG: Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 1980; 18: 493-500
- (45) Pollock CA, Lawrence JR, Field MJ: Tubular sodium handling and tubuloglomerular feedback in experimental diabetes mellitus. *Am J Physiol* 1991; 260: F946-F952
- (46) Quan A, Baum M: The renal nerve is required for regulation of proximal tubule transport by intraluminally produced Ang II. *Am J Physiol* 2001; 280: F524-F529
- (47) Ramchandra R, Barrett CJ, Guild SJ, Malpas SC: Is the chronically denervated kidney supersensitive to catecholamines? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R603-R610

- (48) Rudberg S, Persson B, Dahlquist G: Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy- an 8- year prospective study. *Kidney Int* 1992; 41: 822-828
- (49) Rump LC, Schuster MJ, Wilde K, Schollmeyer P: Modulation of noradrenaline release from rat cortical kidney slices: Effects of angiotensin I and II. *Br J Clin Pharmacol* 1990; 30: 168-170
- (50) Schnermann J, Briggs J: Concentration-dependent sodium chloride transport as the signal in feedback control of glomerular filtration rate. *Kidney Int* 1982; 22 (Suppl 12): 82-89
- (51) Schoeppe W (1988). Diabetes mellitus, Kap. 39, S.665-671. In: Sarre H, Gessler U, Seybold D: *Nierenkrankheiten* (5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York)
- (52) Seyer-Hansen K, Hansen J, Gundersen HJG: Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study. *Diabetologia* 1980; 18: 501-505
- (53) Shostak A, Gotloib L: Increased peritoneal permeability to albumin in streptozotocin diabetic rats. *Kidney Int* 1996; 49: 705-714
- (54) Thomson SC, Bao D, Deng A, Vallon V: Adenosine formed by 5'nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest* 2000; 106: 289-298
- (55) Thomson SC, Deng A, Bao D, Satriano J, Blantz RC, Vallon V: Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest* 2001; 107: 217-224
- (56) Thomson SC, Vallon V, Blantz RC: Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F8-F15
- (57) Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T: Functional consequences of Streptozotocin-induced Diabetes mellitus, with particular references to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44, No.1: 103-150
- (58) Vallon V, Osswald H: Dipyridamole prevents diabetes-induced alterations of kidney function in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994; 349: 217-222
- (59) Vallon V, Wead LM, Blantz RC: Renal hemodynamics and plasma and kidney angiotensin II in established diabetes mellitus in rats: Effect of sodium and salt restriction. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 1761-1767
- (60) Vallon V, Blantz RC, Thomson SC: Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback is reduced in established diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol* 1995; 269: F876-F883
- (61) Vallon V, Blantz RC, Thomson SC: The salt paradox and its possible implications in managing hypertensive diabetic patients. *Curr Hypertension Rep* 2005; 7: 141-147
- (62) Vallon V, Kirschenmann D, Wead LM, Lortie MJ, Satriano J, Blantz RC, Thomson SC: Effect of chronic salt loading on kidney function in early and established diabetes mellitus in rats. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 76-82
- (63) Vallon V, Osswald H, Blantz RC, Thomson SC: Potential role of luminal potassium in tubuloglomerular feedback. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1831-1837

- (64) Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson SC, Osswald H: Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes: Potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2569-2576
- (65) Vallon V, Huang DY, Deng A, Richter K, Blantz RC, Thomson SC: Salt sensitivity of proximal reabsorption alters macula densa salt and explains the paradoxical effect of dietary salt on glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1865-1871
- (66) Vallon V, Blantz RC, Thomson SC: Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early diabetes mellitus: A tubulo-centric view. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 530-537
- (67) Vallon V: Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci* 2003; 8: 169-174
- (68) Vestri S, Okamoto MM; de Fretas HS et al: Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. *J Membr Biol* 2001; 182: 105-112
- (69) Wang T, Chan YL: Neural control of distal tubular bicarbonate and fluid transport. *Am J Physiol* 1989; 26: F72-F76
- (70) Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, Schnermann J: Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am J Physiol* 1994; 266: F227-F239
- (71) Wilcox CS, Lewis PS, Sever PS, Peart WS: The actions of saralasin on the renal circulation of man and dog: Evidence for a sympathetic neural component to vasoconstriction. *Eur J Clin Invest* 1981; 11: 77-83
- (72) Wolf G, Ziyadeh FN: Renal tubular hypertrophy induced by angiotensin II. *Semin Nephrol* 1997; 17(5): 448-454
- (73) Wong PC, Hart SD, Timmermans PB: Effect of angiotensin II antagonism on canine renal sympathetic nerve function. *Hypertension* 1991; 17: 1127-1134
- (74) Zidek W (2001) Diabetische Nephropathie S. 233-239. In: Schatz H (Hrsg) Diabetologie kompakt Grundlagen und Praxis, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Oßwald, dass er mir die Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen ermöglicht hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Volker Vallon für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit bedanken. Von Beginn meiner Arbeit an unterstützte er mich sowohl bei den Experimenten als auch bei der Auswertung der Ergebnisse. Mit allen meinen Fragen und Problemen konnte ich stets zu ihm kommen.

Besonderer Dank gilt Frau Kerstin Richter, die mir das Präparieren der Tiere und das experimentelle Arbeiten beibrachte und mich vom ersten Tag an im Labor betreute. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung wäre die Arbeit nicht zustande gekommen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Priv. Doz. Dr. Gerd Luippold, unter dessen Anleitung ich die Denervierung der Tiere durchführen konnte.

Frau Christine Piesch danke ich für die Hilfe und Auswertung bei den HPLC-Experimenten.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des pharmakologischen Institutes für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und den vielen schönen Stunden, die wir miteinander haben durften.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Verlobten Carl-Daniel bedanken, ohne sein Verständnis und seinen Rat wäre die Arbeit nicht fertig geworden.

## Lebenslauf

Claudia Susanne Birk

Am 06.12.1978 in Tübingen als Tochter von Barbara Birk, geb. Schierenbeck und Dr. Gerhard Birk geboren

1985-1989 Grundschule in Urbach

1989-1998 Max-Planck-Gymnasium Schorndorf mit Abschluß Abitur

1999 Ausbildung zur Rettungssanitäterin

1999-2005 Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2001 Ärztliche Vorprüfung

2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004-2005 Praktisches Jahr, Zollernalb Klinikum gGmbH, Krankenhaus Hechingen, Chirurgie, Innere Medizin, Anästhesie

28.04.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

Seit Juli 2005 Tätigkeit als Assistenzärztin für Anästhesie, Zollernalb Klinikum gGmbH, Krankenhaus Balingen