

Aus der Klinik für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin der Charité,
Campus Virchow Klinikum

**Chronische und akute Regelvorgänge im
Salz-Wasser-Haushalt
- Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems -
- Untersuchungen an wachen Hunden -**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Anaesthesiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Willehad Boemke
geboren am 16.11.1955 in Bremen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

eingereicht am: 25.5.2001

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Rossaint

2. Prof. Dr. med. R. Rettig

Vorwort

Diese Habilitationsarbeit beruht im Wesentlichen auf dem Inhalt der nachfolgend aufgelisteten Publikationen (**P1 – P17**), die in Kopie im Anhang zusammengestellt sind. Damit wird die nach der neuen Habilitationsordnung vom 29. Januar 1999 gegebene Möglichkeit „zur Vorlage publizierter Forschungsergebnisse, die in ihrer Gesamtheit eine Habilitationsschrift gleichwertige wissenschaftliche Leistung darstellen“, genutzt. Weitere Publikationen des Habilitanden, die nicht in dieser Arbeit verwertet wurden, sind in einem separaten Schriftenverzeichnis aufgeführt.

Langzeitversuche

- P1. **Boemke W**, Palm Ü, Kaczmarczyk G, Reinhardt HW. Effect of high sodium and high water intake on 24-h-potassium balance in dogs. *Z. Versuchstierkunde* 33:179-185, 1990.
- P2. Reinhardt HW, **Boemke W**, Palm Ü, Kaczmarczyk G. What causes escape from sodium retaining hormones? *Acta Physiologica Scandinavica* 139 (Suppl. 591):12-17, 1990.
- P3. Reinhardt HW, Palm Ü, Mohnhaupt R, Dannenberg K, **Boemke W**. Computer assisted long term measurements of urinary output and other biological data. *Am. J. Physiol.* 258 (Regulatory Integrative Comp. Physiol 27): R274-R280, 1990.
- P4. Palm Ü, **Boemke W**, Bayerl D, Schnoy N, Juhr N-C, Reinhardt HW. Prevention of catheter-related infections by a new, catheter-restricted antibiotic filling technique. *Laboratory Animals* 25: 142-152, 1991.
- P5. Palm Ü, **Boemke W**, Reinhardt HW. Rhythmicity of urinary sodium excretion, mean arterial blood pressure, and heart rate in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 262 (Heart Circ. Physiol. 31): H149-H156, 1992.
- P6. **Boemke W**, Palm Ü, Corea M, Seeliger E, Reinhardt HW. Endogenous variations and sodium intake-dependent components of diurnal sodium excretion patterns in dogs. *J. Physiology (London)* 476: 547-552, 1994.
- P7. Reinhardt HW, Corea M, **Boemke W**, Pettker R, Rothermund L, Scholz A, Schwietzer G, Persson PB. Resetting of 24-h sodium and water balance during 4 days of servo-controlled reduction of renal perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 266 (Heart Circ. Physiol. 35): H650-H657, 1994.

- P8. **Boemke W**, Palm Ü, Mohnhaupt R, Corea M, Seeliger E, Reinhardt HW. Influence of Captopril on 24-hour balances and the diurnal patterns of urinary output, blood pressure, aldosterone and atrial natriuretic peptide in conscious dogs. *Renal Physiology and Biochemistry* 18: 35-48, 1995.
- P9. **Boemke W**, Seeliger E, Rothermund L, Corea M, Pettker R, Mollenhauer G, Reinhardt HW. ACE inhibition prevents Na and water retention and MABP increase during reduction of renal perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 269 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 38): R481-R489, 1995.
- P10. Reinhardt HW, Seeliger E, Lohmann K, Corea M, **Boemke W**. Changes of blood pressure, sodium excretion and sodium balance due to variations of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 57: 184-187, 1996.
- P11. Corea M, Seeliger E, **Boemke W**, Reinhardt HW. Diurnal pattern of sodium excretion in dogs with and without chronically reduced renal perfusion pressure. *Kidney & Blood Pressure Research* 19: 16-23, 1996.
- P12. Seeliger E, **Boemke W**, Corea M, Encke E, Reinhardt HW. Mechanisms compensating Na and water retention induced by long-term reduction of renal perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 273 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 42): R646-R654, 1997.
- P13. Seeliger E, Persson PB, **Boemke W**, Mollenhauer G, Nafz B, Reinhardt HW. Low dose nitric oxide inhibition causes negative sodium balance in conscious dogs. *Journal of the American Society of Nephrology* 12:1128-1136, 2001.

Kurzzeitversuche

- P14. Krebs MO, **Boemke W**, Simon S, Wenz M, Kaczmarczyk G. Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in conscious dogs decrease renin and is unaffected by losartan. *J. Appl. Physiol.* 86 (1999), 1914-1919.
- P15. Höhne C, Krebs MO, **Boemke W**, Arntz E, Kaczmarczyk G. Evidence that the renin decrease during hypoxia is adenosine-mediated in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 90 (2001), 1842-1848.
- P16. **Boemke W**, Krebs MO, Djalali K, Bünger H, Kaczmarczyk G. Renal nerves are not involved in sodium and water retention during mechanical ventilation in awake dogs. *Anesthesiology* 89 (4)(1998), 942-53.
- P17. Krebs MO, Kröhn T, **Boemke W**, Mohnhaupt R, Kaczmarczyk G. Renal and hemodynamic effects of losartan in conscious dogs during controlled mechanical ventilation. *Am. J. Physiol.* 276 (Renal Physiol. 46) (1999), F425-F432.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
Einführung	7
1 Material und Methodik der Langzeitstudien (P1, P3, P4, P9)	9
1.1 Operative Vorbereitung der Hunde	9
1.2 Prophylaxe katheterbedingter Infektionen (P4).....	9
1.3 Diät	10
1.4 Umgebungsbedingungen	11
1.5 Reduktion und Kontrolle des renalen Perfusionsdruckes.....	13
2 Zirkadiane und ultradiane Veränderungen des Natriumbestandes (P5 - P6) 14	
2.1 Protokolle	14
2.2 Methode der Datenanalyse	15
2.3 Ergebnisse.....	16
2.3.1 Orale Zufuhr	16
2.3.2 Kontinuierliche Infusion einer der oralen Zufuhr entsprechenden Natriummenge	17
2.3.3 24-h-Natrium-Bilanzen während der Dauerinfusion.....	18
2.4 Schlussfolgerung	18
3 Die Nachtverschiebung der Natriumausscheidung: Ein Indikator für Störungen im Salz-Wasserhaushalt? (P8, P10, P11)	19
4 Suche nach den Faktoren, die das Gesamt-Körper-Natrium in engen Grenzen konstant halten (P2, P7, P9, P12)	23
4.1 Das Druck-Escape-Phänomen („pressure escape“) und das RAAS (P7, P9, P12).....	24
4.2 Schlussfolgerung	28
5 Einfluss der Stickoxid (NO)-Synthasehemmung auf die 24 h-Natrium- und Wasserbilanz: Langzeitversuche mit und ohne reduzierten renalen Perfusionsdruck (P13)	29
5.1 Ergebnisse und Diskussion.....	30
5.2 Zusammenfassung und Schlussfolgerung: NOS-Inhibition und RAAS.....	34

6	Hypoxie und RAAS Kurzzeitversuche an wachen Hunden (P14, P15).....	36
6.1	Methodik.....	37
6.2	Resultate und Diskussion	38
7	Natrium- und Wasserretention bei Beatmung mit positiv-end- expiratorischem Druck (PEEP): Rolle des RAAS und des sympathischen Nervensystems der Niere (P16, P17).....	42
7.1	Methodik.....	44
7.2	Ergebnisse.....	46
7.3	Diskussion	48
8	Zusammenfassung und Ausblick	51
9	Literaturverzeichnis.....	56
10	Danksagung.....	67
	Eidesstattliche Versicherung	69
	Anhang: Publikationen.....	70
	Langzeitversuche: P1 – P13	
	Kurzzeitversuche: P14 – P17	

ABKÜRZUNGEN

ADH	Antidiuretisches Hormon im Plasma;
Aldo	Aldosteron im Plasma;
Ang II oder A II	Angiotensin II im Plasma;
ANP	Atriales natriuretisches Peptid im Plasma;
CMV	Kontrollierte maschinelle Beatmung (controlled mechanical
PEEP-Beatmung	CMV mit positivem end-expiratorischen Druck (pressure);
CPAP	Spontanatmung mit kontinuierlichem positiven Atemwegsdruck (continuous positive airway pressure);
EZR	Extrazellulärraum;
EZV	Extrazellulärvolumen;
FE _{Na}	Fraktionelle Natrium-Ausscheidung;
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion;
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate;
GK	Ganzkörper;
HPLC	high performance liquid chromatography;
Kg KG	Kilogramm Körpergewicht;
LN	L-N ^o -Nitroarginin (NOS-Inhibitor);
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck (mean arterial pressure);
NO	Stickoxid (nitric oxide);
NOS	Stickoxid-Synthase (nitric oxide synthase)
PRA	Plasma-Renin-Aktivität;
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System;
RPP	Renaler Perfusionsdruck (renal perfusion pressure);
rRPP oder ↓RPP	reduzierter renaler Perfusionsdruck
↑RPP	Aufheben des reduzierten RPP, so dass der RPP dem systemischen Blutdruck entspricht;
U _K V, U _{Na} V	Kalium- und Natrium-Ausscheidungsrate im Urin;
UV	Harnausscheidungsrate;

Einführung

Die Veröffentlichungen, die in diesen Arbeiten besprochen werden sollen, wurden unter dem Titel subsummiert: „Chronische und akute Regelvorgänge im Salz-Wasser-Haushalt: Die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems - Untersuchungen an wachen Hunden“.

Als ich 1988 in das Team meines früheren Chefs Herrn Prof. Dr. H. Wolfgang Reinhardt in der „Arbeitsgruppe Experimentelle Anästhesie“ eintrat, mußte ich bald feststellen, dass wohl selten der Name „Arbeitsgruppe“ so treffend gewählt worden war, wie in diesem Fall, denn bei den unter der Überschrift «**Langzeituntersuchungen**» dargestellten Protokollen erstreckte sich ein *Einzel*-Versuchsdurchgang über einen Zeitraum von bis zu einer Woche. Es verwundert daher nicht, dass jedes dieser Projekte nur durch ausgeprägte Teamarbeit und großes Engagement von Wissenschaftlern, medizinisch-technischen Assistentinnen, Doktoranden und Tierpflegern realisierbar war.

Der chronologischen Entwicklung gewissermaßen folgend, wird einleitend zunächst die Methodik der Langzeituntersuchung wacher Hunde beschrieben werden. Es wird gezeigt werden, wie mit dieser Untersuchungstechnik ultradiane (kurzfristige Veränderungen über den Tag) und circadiane Veränderungen (24-h-Veränderungen) der renalen Auscheidungsparameter, verschiedener Hormone und hämodynamischer Parameter erfasst werden können. Wegen der Vielzahl der erhobenen Befunde können in dieser Synopsis ultradiane und circadiane Veränderungen im Natrium- und Wasserhaushalt nur anhand ausgewählter Beispiele besprochen werden. So werden ultradiane Veränderungen der Natriumausscheidungen während oraler Nahrungs- und Natriumzufuhr verglichen werden mit kontinuierlicher intravenöser Natriuminfusion. Nachfolgend werden die ultradianen Veränderungen der Natrium- und Wasserausscheidung in verschiedenen Protokollen mit und ohne kontinuierlich reduziertem renalen Perfusionsdruck beschrieben werden. Es wird der Frage nachgegangen werden, ob und gegebenenfalls welche Bedeutung diese Veränderungen für die 24-h-Natrium- und Wasserbilanz haben. Mit 24-h-Bilanzstudien wird dann versucht werden, die Frage zu beantworten, mit welchen wesentlichen Mechanismen der Körper seinen Gesamtkörper (GK)-Natrium- und Wasserbestand konstant hält und abschließend, welche Auswirkungen eine Blockade der Stickoxid (NO)-Synthese auf den Natrium- und Wasserbestand des Körpers hat.

In der AG Experimentelle Anästhesie wurden jedoch nicht nur Langzeitversuche durchgeführt, sondern parallel dazu auch «**Kurzzeitversuche**», d.h. Versuche von 3-6 stündiger Dauer. Dies war in den letzten Jahren die Domäne der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Gabriele Kaczmarczyk. In einer Vielzahl von Untersuchungen wurden unter ihrer Leitung an wachen Hunden systematisch u.a. die Auswirkungen von Hypoxie und Beatmung auf die Regelvorgänge im Salzwasser-Haushalt untersucht. Diesen für mich als Anästhesisten besonders interessanten Fragestellungen widme ich mich seit nunmehr ca. 5 Jahren. Die Auswirkungen der Hypoxie auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die Bedeutung des renalen Sympathikus und des RAAS auf die unter Beatmung zu beobachtende Natrium- und Wasserretention werden in dieser Synopsis beispielhaft besprochen werden.

1 Material und Methodik der Langzeitstudien (P1, P3, P4, P9)

Regelsysteme, die denen des Menschen zumindest qualitativ vergleichbar sind, finden sich nur bei höher entwickelten Säugetieren und können deshalb auch nur dort untersucht werden („integrative whole-body physiology“ = integrative „Ganz-Körper“-Physiologie) (Reinhardt et al. 1990c). Regulationsvorgänge, die Bestandsänderungen im Natriumhaushalt betreffen, erstrecken sich über einen Zeitraum von Stunden bis zu vielen Tagen. Zur Erforschung solcher Fragen ist daher ein methodisch-apparatives Versuchsdesign erforderlich, bei dem über eine Periode von mehreren Tagen Bilanz- und Hämodynamik-Daten sowie Blutparameter bestimmt werden können. Die nachfolgend beschriebene Methodik gestattet es nicht nur, die circadianen (24-h Intervalle) Veränderungen zu erfassen und auszuwerten, sondern auch die ultradianen (Veränderungen während des Tages).

1.1 Operative Vorbereitung der Hunde

Für die Langzeitversuche werden die Hunde unter aseptischen Bedingungen in Intubationsnarkose (Halothan, Lachgas, Sauerstoff) mit einem V. cava-Katheter (eingeführt über die V. femoralis) und zwei Aortenkathetern - einen oberhalb der Nierenarterien und einen unterhalb der Nierenarterien (eingeführt über die A. femoralis) - versorgt. In einer zweiten Operation werden ein Blasenkatheter und eine aufblasbare Manschette um die Aorta oberhalb der Nierenarterien implantiert [Details siehe Boemke et al. 1995 (P8); Reinhardt et al. 1990b (P3); Reinhardt et al. 1994 (P7)]. Alle Katheter werden in der Nackenregion ausgeleitet. Nach den Operationen können sich die Hunde mindestens drei Wochen erholen. Zum Schutz der Katheter tragen sie Leinenjacken.

1.2 Prophylaxe katheterbedingter Infektionen (P4)

Infektionen können die Regulationsvorgänge im Salz-Wasser-Haushalt und das Wohlergehen der Hunde stark beeinflussen. Katheterbedingte Infektionen müssen daher unbedingt verhindert werden (die vaskulären Katheter verbleiben mehrere Monate im Hund!). Dies wird durch eine in der Arbeitsgruppe entwickelte Technik gewährleistet, bei der *nur das Katheterlumen* mit einem Gentamycin/ α -Chymotrypsin-Gemisch gefüllt wird (Palm et al. 1991 (P4); Reinhardt et al. 1992). In der Humanmedizin wird ein ähnliches Verfahren erfolgreich unter dem Begriff „antibiotic-lock technique“ eingesetzt (Messing et

al. 1988), wobei allerdings - im Gegensatz zu unserer Technik - das Katheterlumen mit dem Antibiotikum gespült wird und so ein Teil des Antibiotikums in den Blutkreislauf gelangt, was zu Resistenzbildungen Anlass geben könnte.

Der Gesundheitszustand der Hunde wird täglich protokolliert (Körpergewicht, Temperatur, Allgemeinzustand und Zustand der Katheteraustrittsstellen). Einmal wöchentlich und vor Versuchsbeginn wird die Blutsenkungsgeschwindigkeit überprüft, um u.a. mögliche Infektionen frühzeitig zu erkennen.

1.3 Diät

Einfuhr-/Ausfuhr-Bilanzen für Wasser, Natrium und Kalium werden ermittelt, indem von der Zufuhr die renale und extra-renale Ausscheidung des entsprechenden Parameters subtrahiert werden. Um verlässliche Bilanzdaten zu erhalten, müssen daher alle drei Komponenten – Zufuhr, renale und extra-renale Ausscheidung - kontrolliert bzw. standardisiert werden (Details in Boemke et al. 1990 (P1); Reinhardt et al. 1990b (P3)).

Um ein stabiles prä-experimentelles Einfuhr-/Ausfuhr-Gleichgewicht einzustellen und eine vergleichbare Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems sicherzustellen, erhielten die Hunde bereits fünf Tage vor Versuchsbeginn ein Futtergemisch bestehend aus Hackfleisch, Reis und Wasser, das entsprechend dem Körpergewicht des einzelnen Hundes individuell zubereitet wurde. Die Natrium-, Kalium- und Wasserzufuhr kann je nach experimentellen Bedürfnissen variiert werden. In den hier vorgestellten Protokollen betrug die Natriumzufuhr beispielsweise 0,5 mmol bei niedriger, 2,5 bei normaler, 5,5 bei hoher und 14,5 bei sehr hoher Zufuhr (alle Werte pro Kilogramm Körpergewicht (kg KG) und Tag). Die Kaliumzufuhr betrug immer 3.5 mmol, die Wasserzufuhr 91 ml pro kgKG und Tag. Die mit der Nahrung verabreichten Kalorien ($277 \text{ kJ} \cdot \text{kg KG}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$) waren ausreichend, um das Körpergewicht der Hunde über Wochen konstant zu halten (Reinhardt et al. 1990b (P3)). Das Futter wurde einmal täglich zwischen 8:00 und 8:30 Uhr verabreicht. Die Hunde fraßen das Futter üblicherweise innerhalb von 20 Minuten. In seltenen Fällen war es nötig, nichtgefressenes Futter per Magensonde zu verfüttern. Eine vollständige Nahrungszufuhr war somit in jedem Falle sichergestellt. Bis zur Fütterung am nächsten Tag war den Hunden keine weitere Nahrungs- und Wasseraufnahme möglich. Die Natrium- und Wasser-Zufuhr war somit hinsichtlich der täglichen Fütterungszeit, der Dauer der Nahrungsaufnahme und der Futterzusammensetzung standardisiert. Die extra-renalen Wasser- und Natriumverluste wurden als konstant angenommen, da die

körperliche Aktivität, die Körpertemperatur und die Umgebungsbedingungen sich nicht änderten.

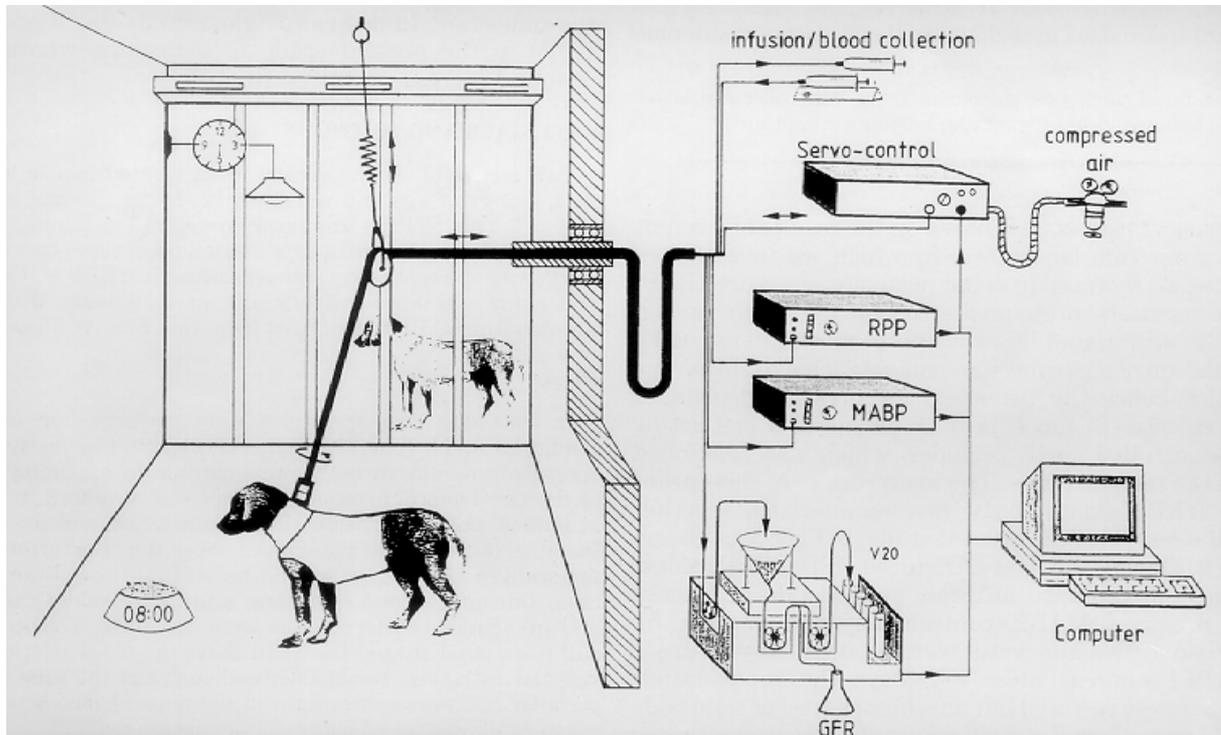


Abb. 1: Experimenteller Aufbau.

Links: Hund in der 9 m² Untersuchungsbox angekoppelt an das Drehkupplungssystem. *Hintergrund:* Hund in einer angrenzenden Box. *Rechts:* Die vom Hund kommenden Schläuche und Kabel werden ins Labor geleitet, wo sich folgende Geräte befinden: Druckaufnehmer und Monitore für die Messung des arteriellen Blutdrucks und renalen Perfusionsdrucks, der Servokontroller für die Reduktion des renalen Perfusionsdrucks, ein Fraktionssammler für die 20-minütige Urinprobenentnahmen und Elektropumpen für die Infusion von Medikamenten und für Blutentnahmen. Die erhobenen Daten werden on-line auf einem Computer gespeichert [Abbildung entnommen aus Boemke et al. 1995 (P9)].

1.4 Umgebungsbedingungen

Während der vier Versuchstage wurden jeweils zwei Hunde in einem klimatisierten Versuchsraum gehalten, der durch ein Gitter in zwei 9 m² große Hälften unterteilt war (21°C, 55 % Luftfeuchtigkeit). Die Hunde konnten simultan untersucht werden. Das soziale Wohlbefinden wurde durch den Blick- und Riechkontakt der Hunde gefördert.

Früher war es üblich, die Hunde während der Versuche im Stoffwechselkäfig zu halten. Das in der Abb. 1 dargestellte Versuchsdesign stellt daher eine wesentliche Verbesserung für die im Versuch befindlichen Hunde dar und dient dazu,

umgebungsbedingte Störfaktoren (z.B. Stress durch Bewegungsmangel), die sich in unbekannter oder unvorhersehbarer Art und Weise auf die gemessenen Parameter auswirken können, weiter zu vermindern.

Während der Versuche wurden die implantierten Katheter über ein Drehkupplungssystem, das an der Leinenjacke angebracht wurde, mit dem Nebenraum (Labor) verbunden. Die Konstruktion gewährleistete, dass sich die Hunde im Untersuchungsraum völlig frei bewegen konnten (Abb. 1). Das Drehkupplungssystem ist ein kompliziertes Gebilde, dessen Funktionen ausführlich in der Arbeit von Reinhardt et al. (1990b) dargestellt werden. Es wird in unseren Forschungswerkstätten vom Feinmechanikermeister Herrn Klaus Dannenberg produziert. Durch Modifikationen am Drehkupplungssystem war es uns auch möglich, Temperatur- (Reinhardt et al. 1990b), Flussmessersignale (Nienhaus 1993) sowie links- und rechts-atriale Drucke („Luftkapselkatheter“-Technik) [Affeld et al. 1975; Reinhardt et al. 1990a (P2)] am wachen, sich bewegenden Hund langfristig kontinuierlich abzuleiten (Abb. 2).

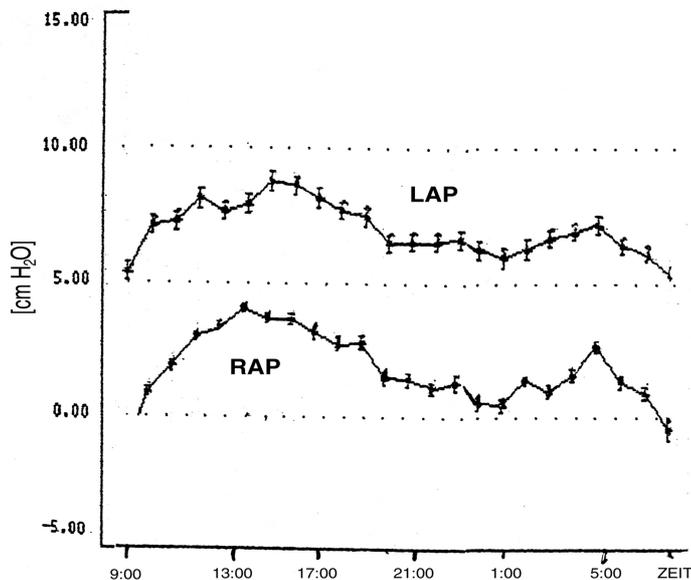


Abb. 2:

Registrierung des linken (LAP) und rechten (RAP) Vorhofdrucks am sich frei bewegenden Hund während eines Kontroll-Tages unter Verwendung des „Luftkapselkatheters“ (Zeit = Uhrzeit), Futteraufnahme von 8:00 bis 8:30 Uhr.

Vom Labor aus konnten Blutentnahmen (üblicherweise alle 4 Stunden Tag und Nacht) und Blasenentleerungen (alle 20 min) automatisiert vorgenommen werden, ohne dass die Hunde etwas davon merkten [Details in Boemke et al. 1995b (P9); Reinhardt et al. 1990b

(P3)]. Dies wurde aus dem Fehlen hämodynamischer und hormoneller Reaktionen während der Blutentnahmen und Blasenentleerungen sowie aus Beobachtungen des Verhaltens der Hunde über ein Videoüberwachungs-System geschlossen.

Das während der Versuche entnommene Blut wurde sofort nach der Entnahme durch Blut ersetzt, das den Hunden ca. zwei Wochen vor Versuchsbeginn entnommen und in Bluttransfusionsbeuteln aufbewahrt worden war.

1.5 Reduktion und Kontrolle des renalen Perfusionsdruckes

Bei den Versuchen, bei denen der renale Perfusionsdruck auf einem gewünschten Niveau konstant gehalten werden sollte, wurde ein elektropneumatisches, schnell arbeitendes Servokontrollsystem eingesetzt. Dieses System wurde von Dr. Benno Nafz konstruiert, der damals noch bei Prof. Dr. med. H. Kirchheim in Heidelberg und heute bei Prof. Dr. med. P.B. Persson in der Physiologie der Charité arbeitet (Nafz et al. 1992). Dabei wird das Druckwandlersignal des unterhalb der Nierenarterie befindlichen arteriellen Katheters zur Steuerung der Be- und Entlüftung einer um die Aorta gelegten Manschette benutzt [näheres siehe Nafz et al. 1992; Reinhardt et al. 1994 (P7)] und so der renale Perfusionsdruck auf dem gewünschten Niveau gehalten. Die Genauigkeit der Servokontrolle war auch bei Druckgradienten über 60 mmHg zwischen renalem Perfusionsdruck und mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP) unverändert gut [Reinhardt et al. 1994 (P7)]. In den nachfolgend (S. 23 - 25) beschriebenen Untersuchungen wurde ein renaler Perfusionsdruck eingestellt, der 20 Prozent unter dem Blutdruck lag, der für den individuellen Hund in mehreren 24-stündigen Kontrollperioden ermittelt worden war.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Hunde operativ deinstrumentiert und nach einer mehrwöchigen Erholungszeit und abschließender tierärztlicher Untersuchung mit Hilfe unserer Tierärzte an ausgewählte, mit der Hundehaltung vertraute Privatpersonen abgegeben.

Alle nachfolgend beschriebenen Tierversuchsprotokolle wurden von der zuständigen Behörde des Landes Berlin genehmigt.

2 Zirkadiane und ultradiane Veränderungen des Natriumbestandes (P5 - P6)

Wie oben beschrieben, wurde während der mehrtägigen Untersuchungen der Hunde automatisiert in 20 min Intervallen die Blase über das Drehkupplungssystem entleert, der Urin gewogen und analysiert, sowie der Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich als 1 min Mittelwerte gespeichert. Blutentnahmen erfolgten alle vier Stunden, Tag und Nacht (Methodik s. S. 11-13). Betrachtet man die so gewonnenen Messwerte, dann erkennt man innerhalb eines 24-h-Intervalls z. T. deutliche Schwankungen, sog. Oszillationen.

Spontane Oszillationen physiologischer Messgrößen sind Phänomene, die sich bei vielen Spezies nachweisen lassen. Es ist deshalb bei experimentellen Studien stets daran zu denken, dass zeitabhängige Veränderungen einer Variablen nicht das Resultat eines experimentellen Reizes sein müssen, sondern durch sogenannte endogene Rhythmizität oder unkontrollierte externe Stimuli, z. B. Lärm, Einfluss des Untersuchers, variable Futterzufuhr oder unterschiedliche Infusionsraten, verursacht sein können. Für alle experimentellen Untersuchungen ist es daher wichtig, zeitabhängige Kontrollen durchzuführen, die neben konstanten Umgebungsbedingungen u.a. die Dauer und die Uhrzeit, zu der die Experimente durchgeführt werden, berücksichtigen.

In einer der ersten Untersuchungen mit der oben beschriebenen Methodik [Boemke et al. 1994 (P6); Palm 1990; Palm et al. 1992 (P5)] sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

1. Zeigen Hunde unter definierten Ernährungs- und Umweltbedingungen ein reproduzierbares Ausscheidungsmuster? Lassen sich Rhythmen nachweisen?
 1. Wenn ja, wie stabil sind diese Rhythmen?
 2. Lassen sich bei den Verläufen endo- und exogene Anteile unterscheiden?
 3. Welchen Einfluss hat die Höhe der Natriumzufuhr auf die Ausscheidungsverläufe?
 4. Unterscheiden sich die 24-h-Bilanzen bei oraler und kontinuierlicher intravenöser Zufuhr?

2.1 Protokolle

Untersucht wurde der Ausscheidungsverlauf von Natrium unter zwei Bedingungen:

1. während eines Tages mit *oralen Nahrungsaufnahme* und definierter oraler Natriumzufuhr (Nahrungsaufnahme innerhalb von 30 min; „Bolus“), und
2. während zweier Tage mit *konstanter intravenöser (i.v.) Infusion* der gleichen täglichen Natriummenge wie bei oraler Zufuhr [Dauerinfusionsversuche (DI)].

Die insgesamt verabreichte Natriummenge war am Tag mit oraler Zufuhr und an jedem Infusionstag genau gleich.

Die Versuche wurden mit *sehr hoher* (14,5) und *normaler* (2,5 mmol Na · kg KG⁻¹ · 24h⁻¹) Natriumzufuhr durchgeführt.

Der Elektrolytinfusion wurde Glukose zugesetzt, um eine Hungernatriurese zu vermeiden. Eine Glukosurie trat nicht auf.

Die Nahrungszufuhr erfolgte an den oralen Zufahrtagen zwischen 8:00 und 8:30 Uhr. Bereits fünf Tage vor Beginn der Experimente wurden die Hunde mit der entsprechenden Diät ernährt, um in ein stabiles Einfuhr-Ausfuhr-Gleichgewicht zu kommen. Der Tag-Nacht-Zyklus vor und während der Experimente betrug 12:12 Stunden, d.h. Licht „an“ morgens 6:00 Uhr, Licht „aus“ abends 18 Uhr (weiteres zur Methodik s. S. 9-13).

2.2 Methode der Datenanalyse

Um die Schwankungen im Natriumausscheidungsverlauf *quantitativ* zu beschreiben, wurden Mittelwerte der Urin-Natrium-Ausscheidung und deren Standardabweichung berechnet.

Außerdem war es wegen der großen Zahl der erhobenen Daten (z. B. 72 Urinproben und 1440 Blutdruckwerte pro Tag) möglich, diese mit speziellen mathematischen Verfahren auszuwerten. Hierzu wurde von Dr. Ülo Palm eigens ein Zeitreihenanalyseverfahren entwickelt (Palm et al. 1992 (P5), Palm 1990), das auf der Cosinor und Fourier-Analyse basiert (Hickey et al. 1984; Nelson et al. 1979; Van Cauter et al. 1973).

Das Prinzip dieser Methode, die wir **FPN-Methode** nennen, besteht darin, die Varianz der Daten in eine Grund- oder Fundamental-Schwingung (**F**), einige schwächere Teil- oder Partialschwingungen (**P**) und in eine Rauschkomponente (englisch „noise“) (**N**) zu zerlegen (auf Details soll hier nicht eingegangen werden, näheres entnehmen Sie bitte Palm et al. 1992).

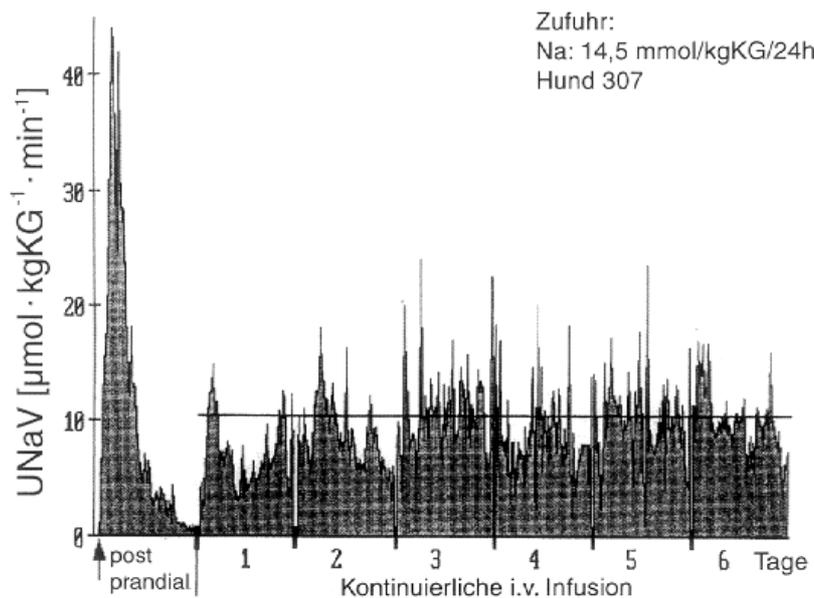
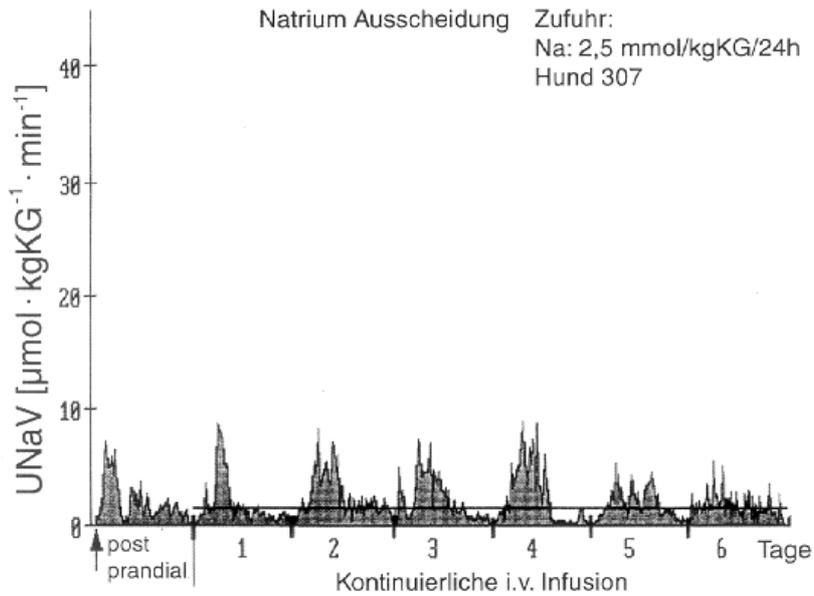


Abb. 3:

Originalverlauf der Natriumausscheidung (U_{NaV}) eines Hundes bei normaler ($2,5 \text{ mmol Na} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$) und sehr hoher Natriumzufuhr ($14,5 \text{ mmol Na} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$), an einem Tag mit oraler Futteraufnahme sowie an sechs Infusionstagen.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Orale Zufuhr

Bei oraler Natriumzufuhr zeigen Hunde, die einmal täglich um 8 Uhr gefüttert werden ein eindeutig rhythmisches Ausscheidungsmuster. Sowohl bei normaler Salzzufuhr, als auch bei hoher Salzzufuhr kommt es bei allen Hunden zu einem Anstieg der

Natriumausscheidung im Urin. Sie erreicht um die Mittagsstunden ihr Maximum. (postprandiales Maximum). Bis 17:00 Uhr werden ca. 60-70 % der täglichen Natriumzufuhr ausgeschieden. In der Nacht fallen die Werte gegen Null. Während des ganzen Tages finden sich kleine ultradiane Schwankungen.

Während *hoher Natriumzufuhr* scheint dieses Ausscheidungsverhalten zum großen Teil eine reaktive Antwort auf die große, impulsförmig zugeführte Natriummenge zu sein, die zu einer Expansion des Extrazellulärtraumes führt und natriumeliminierende Systeme aktiviert (Impuls-Antwort-Kurve der Natriumausscheidung).

Bei *normaler Salzzufuhr* fand sich ebenfalls ein postprandiales Ausscheidungsmaximum, jedoch waren hier ähnlich hohe Ausscheidungsmaxima wie bei oraler Zufuhr auch unter kontinuierlicher Infusion zu beobachten. Diese traten während der Dauerinfusion jedoch nicht zu definierten Zeitpunkten auf, sondern lagen variabel über den Tag verteilt.

Die Futterzufuhr selbst oder die Natriumzufuhr dienen wahrscheinlich als Zeitgeber, die die natriumeliminierenden Systeme aktivieren und synchronisieren.

Der Vergleich der Muster der Verläufe bei normaler und hoher Salzzufuhr vermittelt den Eindruck, dass zwar die mittlere Ausscheidungsrate bei hoher Zufuhr deutlich höher liegt, die Schwankungsbreite aber etwa die gleiche Größenordnung aufweist wie bei normaler Zufuhr [Boemke et al. 1994 (P6)].

2.3.2 Kontinuierliche Infusion einer der oralen Zufuhr entsprechenden

Natriummenge

Wird über 24 Stunden die gleiche Natriummenge kontinuierlich infundiert, die bei oraler Zufuhr quasi bolusförmig aufgenommen wird, so verlieren die rhythmischen Komponenten mit zunehmender Dauer der Infusion an Kraft, Zeichen der Desynchronisation werden sichtbar, und der Rauschanteil nimmt zu.

Der während der Infusion *hoher* Natriummengen sichtbare konstante Anteil der Natriumausscheidung ($5-6 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; sog. „Sockelbetrag“) kann als reaktive homeostatische Antwort auf die hohe Natriumzufuhr angesehen werden. Dieser „Sockelbetrag“ mag nötig sein, um das hohe Natriumload innerhalb einer angemessenen Zeit auszuscheiden. Die dem „Sockel“ aufgelagerte fluktuierende Komponente könnte durch endogene Rhythmizität und Schwankungen nicht-rhythmischer Art verursacht sein.

Während der Infusion *normaler* Natriummengen war nahezu kein „Sockelbetrag“ sichtbar. Außerdem waren die mittlere Natriumausscheidung, die Varianz und die Maxima bei kontinuierlicher Infusion etwa gleich hoch wie bei oraler Natriumzufuhr.

Es kann daher angenommen werden, dass unter *normaler* Salzzufuhr endogen induzierte Fluktuationen der Natriumausscheidung zu einem großen Teil an der Aufrechterhaltung der Natriumhomöostase beteiligt sind.

2.3.3 24-h-Natrium-Bilanzen während der Dauerinfusion

Wir konnten am ersten Dauerinfusionstag meist eine Natriumretention, also eine Zunahme des Natriumbestandes beobachten. Am zweiten Infusionstag wurde die retinierte Natriummenge über die infundierte Natriummenge hinaus wieder ausgeschieden, so dass der Natriumbestand etwa wieder auf das alte Niveau zurückkehrte. Das heißt, obwohl sich das Natriumausscheidungsmuster unter kontinuierlicher Infusion z. T. beträchtlich von dem bei oraler Zufuhr unterschied, hatte dies langfristig keinerlei Auswirkungen auf die Fähigkeit wacher Hunde, ihr 24-h-Natrium-Einfuhr-/Ausfuhr-Gleichgewicht zu halten, mehr noch, sie fanden zum Ausgangspunkt ihres Natriumbestandes zurück!

2.4 Schlussfolgerung

Das Natriumausscheidungsmuster bei Hunden scheint das Resultat endogener Rhythmizität und exogener, reaktiver Prozesse zu sein. Beide Komponenten wirken mit bei der Aufrechterhaltung der Natriumhomöostase. Der Anteil, der jeder der beiden Komponenten dabei zukommt, ist u.a. abhängig von der Höhe der Natriumzufuhr. Die konstante Infusion einer bestimmten Natriummenge garantiert keineswegs eine konstante Ausscheidung. Theoretisch sollte es nach unseren Berechnungen möglich sein, pro Tag eine Natriummenge von ca. 5 mmol pro Kilogramm Körpergewicht durch die Aktivität endogener Mechanismen auszuschcheiden – d.h. ohne dass hierfür eine konstante basale Natriumausscheidung nötig wäre [Boemke et al. 1994 (P6)].

3 Die Nachtverschiebung der Natriumausscheidung: Ein Indikator für Störungen im Salz-Wasserhaushalt? (P8, P10, P11)

Um Verschiebungen im Ausscheidungsverlauf über die Zeit (Ausscheidungsmuster) analysieren zu können, ist ein reproduzierbarer Ausscheidungsverlauf unter Kontrollbedingungen nötig. Wie soeben beschrieben, ist diese Voraussetzung bei der von uns verwendeten Methode während oraler Nahrungszufuhr gegeben [Boemke et al. 1995 (P8)]. Die Ausscheidungsraten für das Urinvolumen (U_V), Natrium (U_{NaV}) und Kalium (U_{KV}) sind postprandial um die Mittagszeit am größten, fallen während des Nachmittags und Abends stetig ab und befinden sich während der Nacht auf sehr niedrigem Niveau (Abb. 4).

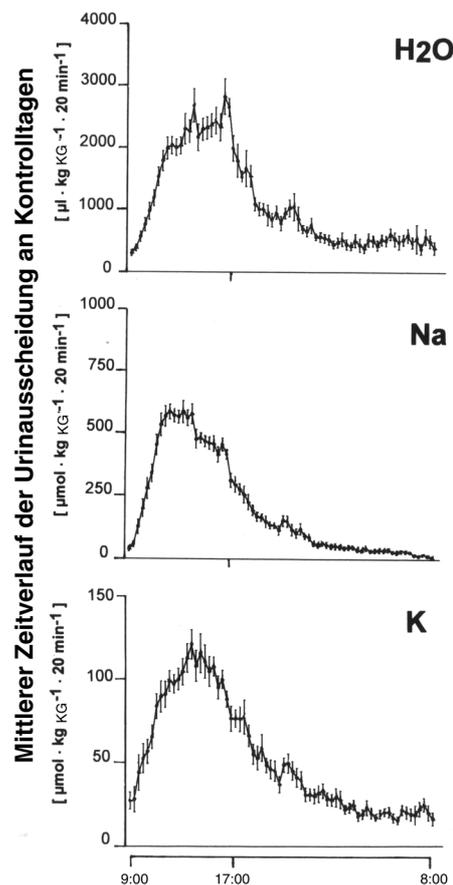


Abb. 4:

Zeitverlauf von Urinvolumen (H₂O), Natrium- (Na) und Kaliumausscheidung (K) während eines Kontrolltages. Zufuhr: 91 ml H₂O, 14,5 mmol Na, 3, 5 mmol K pro kg Körpergewicht und Tag. Mittelwert ± SEM, n = 12 [aus Boemke et al. 1995 (P8)].

Wir bezeichnen diese postprandialen Ausscheidungsverläufe als Impuls-Antwort-Kurven (Impuls: bolusförmige Natrium-, Kalium- und Wasseraufnahme, Antwort: der typische, eben beschriebene Ausscheidungsverlauf) (s.S. 16-17).

Bereits in frühen Untersuchungen stellten wir fest, dass die Infusion natriumretinierender Hormone wie Aldosteron (Reinhardt et al. 1990) und Angiotensin II (Reinhardt et al. 1987) das Ausscheidungsmuster von Natrium und Wasser bei unseren Versuchshunden in charakteristischer Weise verändert: ein größerer Anteil der täglichen Natrium- und Wasserausscheidung verschob sich unter diesen Bedingungen in die Abend- und Nachtstunden. Wir haben dieses Phänomen deshalb als „Nachtverschiebung“ („night shift“) bezeichnet. Die Nachtverschiebung blieb auch dann noch bestehen, als die 24-Stunden-Tagesbilanzen von Natrium und Wasser bereits wieder ausgeglichen waren, d.h. nachdem es zum „Escape“ gekommen war. Verminderung der Ausscheidungsmaxima und eine „Nachtverschiebung“ fanden wir auch bei kontinuierlich reduziertem renalen Perfusions-Druck (rRPP). Hierbei stieg das GK-Natrium und Wasser während des ersten rRPP-Tages transient an (positive Natriumbilanz) und blieb dann auf dem erhöhten Niveau konstant (ausgeglichene Natriumbilanz) [Corea et al. 1996 (P11); Reinhardt et al. 1996 (P10)] (Abb. 5). Wird unter rRPP gleichzeitig kontinuierlich der ACE-Hemmer Captopril infundiert (rRPP+Capto-Protokoll), so finden sich ähnliche Veränderungen, und das, obwohl die 24-h-Natriumbilanzen an allen rRPP+Capto-Tagen ausgeglichen waren [Reinhardt et al. 1996 (P10)] (Abb. 5).

Auch bei einer negativen Natriumtagesbilanz kann es zur Nachtverschiebung kommen, wie wir in einem Protokoll zeigen konnten, in dem wir Captopril über fünf Tage infundierten. Die Veränderungen des Ausscheidungsmusters stellten wir in *Differenzkurven* (Ausscheidung an Kontrolltagen minus der Ausscheidung während der Captopril tage in korrespondierenden Zeitintervallen) dar [siehe Boemke et al. 1995 (P8)]. Die quantitativen Änderungen beschrieben wir durch die Berechnung des *Tag/Nacht-Verhältnisses* (Ausscheidung während des Tages dividiert durch die Ausscheidung während der Nacht) [siehe Boemke et al. 1995 (P8)].

Die Nachtverschiebung der Ausscheidung konnte weder auf kurzfristige Änderungen des Blutdrucks (Abb. 6) noch der gemessenen Hormone [Boemke et al. (P8); Corea et al. 1996 (11)] noch auf Natrium-Bestandsänderungen, Änderungen des Natrium-Loads oder Änderungen der GFR zurückgeführt werden.

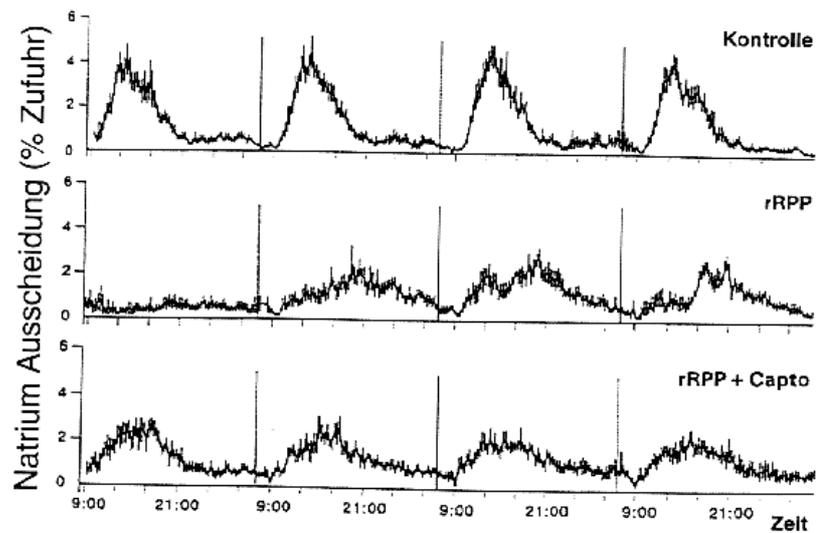


Abb. 5:

Natrium-Ausscheidung während vier Kontroll- (oben), rRPP- (Mitte) und rRPP+Capto- (unten) Tagen. Orale Natriumzufuhr $5,5 \text{ mmol Na} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$; Fütterung zwischen 8:00 und 8:30 Uhr. Mittelwert \pm SEM, $n = 7$ pro Gruppe [nach Reinhardt et al. 1996 (P10)]

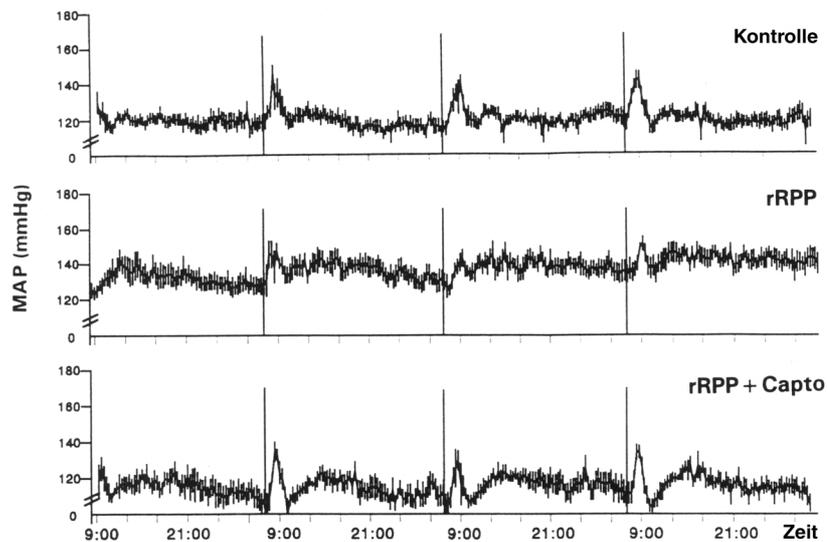


Abb. 6:

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) während vier Kontroll- (oben), rRPP- (Mitte) und rRPP+Capto- (unten) Tagen. Orale Natriumzufuhr $5,5 \text{ mmol Na} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$; Fütterung zwischen 8:00 und 8:30 Uhr. Mittelwert \pm SEM, $n = 7$ pro Gruppe [nach Reinhardt et al. 1996 (P10)].

Bezüglich der „Nachtverschiebung“ unter rRPP-Bedingungen konnten wir mit Lithium-Clearance-Studien wahrscheinlich machen, dass sie ein Prozess ist, der auf einer verminderten Natriumresorption im distalen Tubulus beruht [Corea et al. 1996 (P11)].

Wie bei unseren Hunden wurden auch beim Menschen Veränderungen des Ausscheidungsmusters im Sinne einer verstärkten Natrium- und Wasserausscheidung während der Abend- und Nachtstunden beschrieben, z.B. bei primärem Hyperaldosteronismus (Lennon et al. 1961), Morbus Cushing (Doe et al. 1960), arterieller Hypertonie (Dyer et al. 1987), kongestiven Herzkrankheiten (Baldwin et al. 1950), älteren Menschen (Pathak & Joshi 1991) und nach Schädel-Hirn-Trauma (Payne & Wardener 1958).

Es deutet danach einiges darauf hin, dass sowohl bei Hunden als auch bei Menschen die „Nachtverschiebung“ ein Hinweis für die Anwesenheit von Störfaktoren ist, die in die „normale“ (ungestörte) Regulation des Salzwasserhaushalts und/oder der Nierenfunktion eingreifen. Die „Nachtverschiebung“ scheint dabei letztlich dem Einstellen einer ausgeglichenen 24-h-Natrium- und Wasserbilanz zu dienen.

4 Suche nach den Faktoren, die das Gesamt-Körper-Natrium in engen Grenzen konstant halten (P2, P7, P9, P12)

Natrium ist das Hauptkation im Extrazellulärraum und damit die wichtigste Determinante für die Osmolalität in diesem Kompartiment. Im gesunden Säugetierorganismus wird die Osmolalität der Körperflüssigkeiten in engen Grenzen konstant gehalten. Dies ist nur möglich, wenn Wasserverluste durch Wasserzufuhr und ein Wasserüberschuss durch Wasserausscheidung korrigiert werden und/oder eine Iso-osmolalität des Extrazellulärspaces durch Natriumausscheidung oder –zufuhr sichergestellt wird. Während „überschüssiges“ Wasser rasch renal ausgeschieden werden kann, ist dies für das Natrium bei weitem nicht mit der gleichen Geschwindigkeit möglich. Unter der Prämisse, dass der Organismus bestrebt ist, die Osmolalität des Extrazellulärspaces weitestgehend konstant zu halten, beeinflusst daher besonders der Natriumbestand des Körpers die Größe des Extrazellulär (EZV)- und Plasmavolumens und damit wiederum den arteriellen Druck. Die Höhe des arteriellen Drucks beeinflusst andererseits die Natrium- und Wasser-Ausscheidung und damit die Größe des Extrazellulär- und Plasmavolumens (Cowley 1992; Guyton 1990; Guyton & Hall 2000). Es wird deshalb heute angenommen, dass der Kontrolle des GK-Natriums eine wesentliche Rolle sowohl bei der Kontrolle des Extrazellulär- und Plasmavolumens als auch des arteriellen Blutdrucks und des renalen Perfusionsdrucks (RPP) zukommt (Guyton & Hall 2000).

Ein weiteres wichtiges System für die Homöostase des Natriumhaushaltes ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Der Stellenwert und die Interaktionen des arteriellen Drucks und des RAAS bei der Langzeitkontrolle des Gesamtkörper-Natrium- (GK-Natrium)-Bestands sind jedoch umstritten. Die nachfolgend beschriebenen Versuche stellen einen ersten Schritt dar, die Bedeutung dieser beiden Faktoren für die GK-Natrium-Bestandskontrolle unter verschiedenen Bedingungen besser zu definieren.

4.1 Das Druck-Escape-Phänomen („pressure escape“) und das RAAS

Die Reduktion des renalen Perfusionsdrucks kann besonders über zwei Mechanismen zur Natriumretention führen: zum einen über die Stimulation der druckabhängigen Reninfreisetzung aus der Niere und dem damit verbundenen Anstieg der Ang II- und Aldosteronkonzentrationen, zum anderen direkt über eine Abschwächung des von Guyton postulierten Drucknatriuresemechanismus bei abnehmendem renalen Perfusionsdruck (Guyton & Hall 2000). Tatsächlich konnte bei einer servokontrollierten 20 %igen Reduktion des renalen Perfusionsdrucks (\downarrow RPP) über vier Tage am ersten Tag eine signifikante Natrium- und Wasserretention und ein Anstieg des arteriellen Mitteldrucks beobachtet werden (Abb. 7). Obwohl der angestiegene arterielle Mitteldruck wegen des servokontrollierten reduzierten renalen Perfusionsdrucks nicht an der Niere wirken konnte, kam es bereits am zweiten Tag zu einem Ausgleich der 24-Stunden-Natriumbilanz [Reinhardt et al. 1994 (P7)]. Dieses Phänomen wurde von uns in Analogie zum Mineralokortikoid-Escape [August et al. 1958; Reinhardt et al. 1990a (P2)] als Druck-Escape („pressure escape“) bezeichnet [Reinhardt et al. 1994 (P7)]. Einer der wesentlichen Gründe für den Ausgleich der 24-Stunden-Natrium-Bilanz war ein Abfall der Aldosteronkonzentration auf das Niveau der Kontrolltage - beginnend mit dem zweiten \downarrow RPP-Tag. Da trotz des Abfalls des Plasma-Aldosterons die am ersten Tag retinierte Natriummenge nicht wieder ausgeschieden wurde, blieb das GK-Natrium trotz des Ausgleichs der 24-Stunden-Bilanzen erhöht (\downarrow RPP-Protokoll; Abb. 7).

In nachfolgenden Untersuchungen konnte nun dreierlei gezeigt werden:

1. Wird das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym bei wachen Hunden durch Captopril blockiert und deren renaler Perfusionsdruck dann für vier Tage mit dem Servokontrollsystem um 20 % gesenkt, kommt es nicht zu einer Natriumretention. Das GK-Natrium bleibt unverändert [Boemke et al. 1995b (P9)] (\downarrow RPP +Capto; Abb. 7).
2. Wird hingegen der Plasma-Aldosteronspiegel (der bei \downarrow RPP während des ersten Tages ansteigt und dann abfällt) durch eine niedrig dosierte kontinuierliche Aldosteroninfusion auf dem erhöhten Niveau des ersten \downarrow RPP-Tages konstant gehalten, kommt es lediglich zu einem *partiellen* „Escape“ [Seeliger et al. 1997 (P12)] (\downarrow RPP+Aldo fix; Abb. 7), d.h. an allen

- vier Untersuchungstagen finden sich positive 24-Stunden-Natriumbilanzen, obwohl das exogen zugeführte Aldosteron die Reninfreisetzung supprimiert und damit auch die Angiotensin II-Plasmaspiegel verringert.
3. Wird zusätzlich zum Aldosteron kontinuierlich eine niedrig dosierte Angiotensin-Infusion appliziert, wird die Natriumretention weiter verstärkt [Seeliger et al. 1997 (P12)] (\downarrow RPP AII+Aldo fix; Abb. 7). Der arterielle Mitteldruck steigt auf über 170 mmHg, und es kommt zur Gewichtszunahme und Ödembildung, die in einigen Fällen so ausgeprägt war, dass die Experimente zum Wohle der Hunde abgebrochen werden mussten.

Diese Experimente zeigen, dass das RAAS eines der wichtigsten Systeme zur Kontrolle des GK-Natriumbestands ist, und dass ein Anstieg des GK-Natriums die Aktivität des RAAS unterdrückt. Über welchen Mechanismus dies geschieht, z.B. eine Expansion des Extrazellulärtraumes, bleibt unklar.

Natrium-eliminierende Faktoren wie das atriale natriuretische Peptid (ANP) oder andere humorale resp. hormonelle Faktoren wie z.B. NO, Kinine, Prostaglandine, Urodilatin oder physikalische Faktoren - wie Änderungen im kolloidosmotischen Druck - oder nervale Faktoren, scheinen in ihrer Gesamtheit offensichtlich nur unzureichend in der Lage zu sein, den natriumretinierenden Effekten des reduzierten renalen Perfusionsdrucks und des gleichzeitig applizierten Aldosterons und Angiotensins entgegenzuwirken. Der Effekt der Summe aller natriumeliminierenden Faktoren kann aus Abb. 7 abgelesen werden: Es ist die Differenz zwischen der virtuellen Natriumretentionsgeraden (die sich ergibt, wenn die retinierte Natriummenge des ersten \downarrow RPP -Tages kumulativ über die weiteren drei Versuchstage fortgeschrieben wird) und der tatsächlich im Protokoll \downarrow RPP mit kombinierter Angiotensin II-plus Aldosteron-Infusion (\downarrow RPP A II +Aldo fix) beobachteten Natriumakkumulation (Abb. 7).

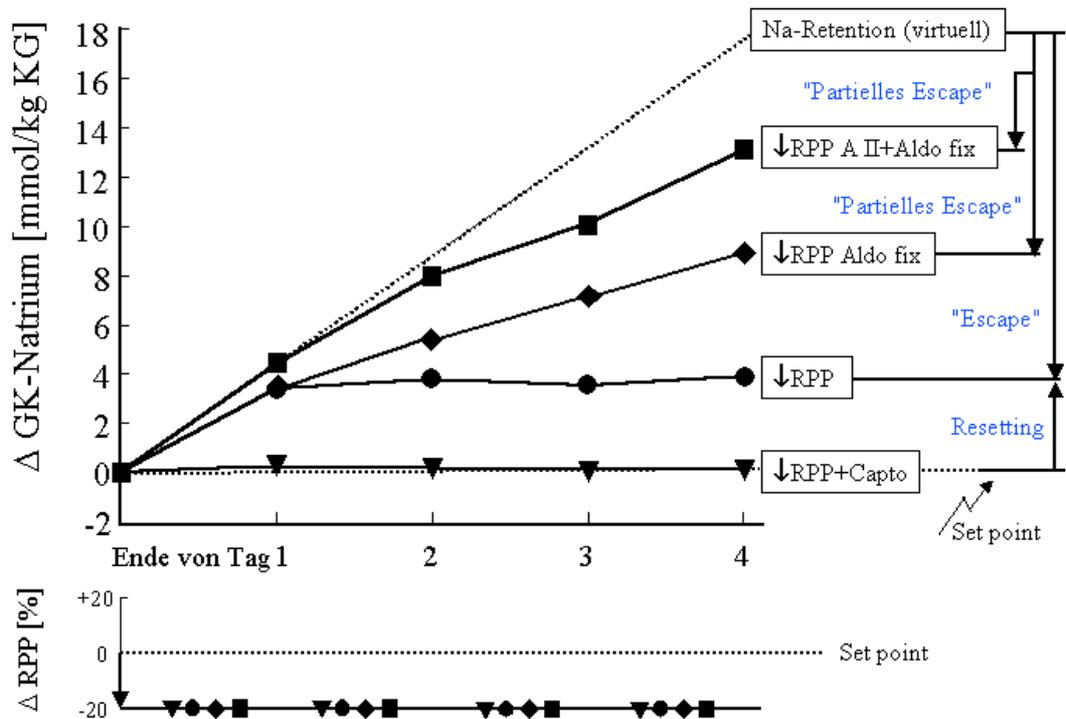


Abb. 7: Beitrag des reduzierten RPP und des RAAS zur Kontrolle des GK-Natrium-Bestands.

Die Veränderungen im GK-Natrium über einen Zeitraum von vier Tagen sind für vier verschiedene Protokolle im *oberen Teil* der Abbildung dargestellt (Na-Zufuhr $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$). Der *untere Teil* zeigt die Reduktion des renalen Perfusionsdrucks während dieser Tage. Sie betrug in allen Protokollen -20% . Näheres siehe Text. Die Daten wurden den Veröffentlichungen P7, P9 und P12 entnommen (s. Anhang). Abbildung mit freundlicher Erlaubnis nach Reinhardt & Seeliger (2000).

Die Reduktion des renalen Perfusionsdrucks führt, wie oben beschrieben, zu einem Ausgleich der Natriumbilanz ab dem zweiten Tag. Das am ersten Tag retinierte Natrium wird jedoch nicht wieder ausgeschieden, d.h. der GK-Natriumbestand bleibt erhöht. Gleichzeitig steigt der mittlere arterielle Blutdruck um 20 bis 25 mmHg. Es stellte sich daher die Frage, ob dieser Blutdruckerhöhung hinreichend groß sein würde, das überschüssige Natrium mittels „Drucknatriurese“ auszuschleiden, wenn die servokontrollierte Reduktion des renalen Perfusionsdrucks nach der initialen eintägigen Retentionsphase aufgehoben werden würde. Nach ihrem Umzug in das Physiologische Institut der Charité führten Reinhardt und Seeliger (2000) deshalb eine weitere Studie - bestehend aus zwei Protokollen - durch, die hier dargestellt werden soll, weil sie das Gesamtbild der

Kontrollvorgänge des GK-Natriumbestandes weiter abrundet¹: Wie oben beschrieben, führt der reduzierte renale Perfusionsdruck am ersten Tag zu einer Stimulation des RAAS und zur Natrium-Retention, während es am zweiten Tag bei weiterhin erhöhten PRA-Werten zu einer endogenen Suppression der Aldosteronfreisetzung und zum Druck-Escape kommt. Beim *ersten Protokoll* wurde daher zusätzlich zur Reduktion des RPP eine niedrig dosierte Angiotensin II- und Aldosteroninfusion durchgeführt, um die Effekte der endogenen RAAS-Suppression „auszugleichen“. Die Servokontrolle des reduzierten renalen Perfusionsdrucks wurde nach dem ersten Tag beendet, so dass der erhöhte arterielle Blutdruck wieder direkt auf die Niere wirken konnte (\uparrow RPP + Ang II + Aldo fix-Protokoll) (Reinhardt & Seeliger 2000) (Abb. 8).

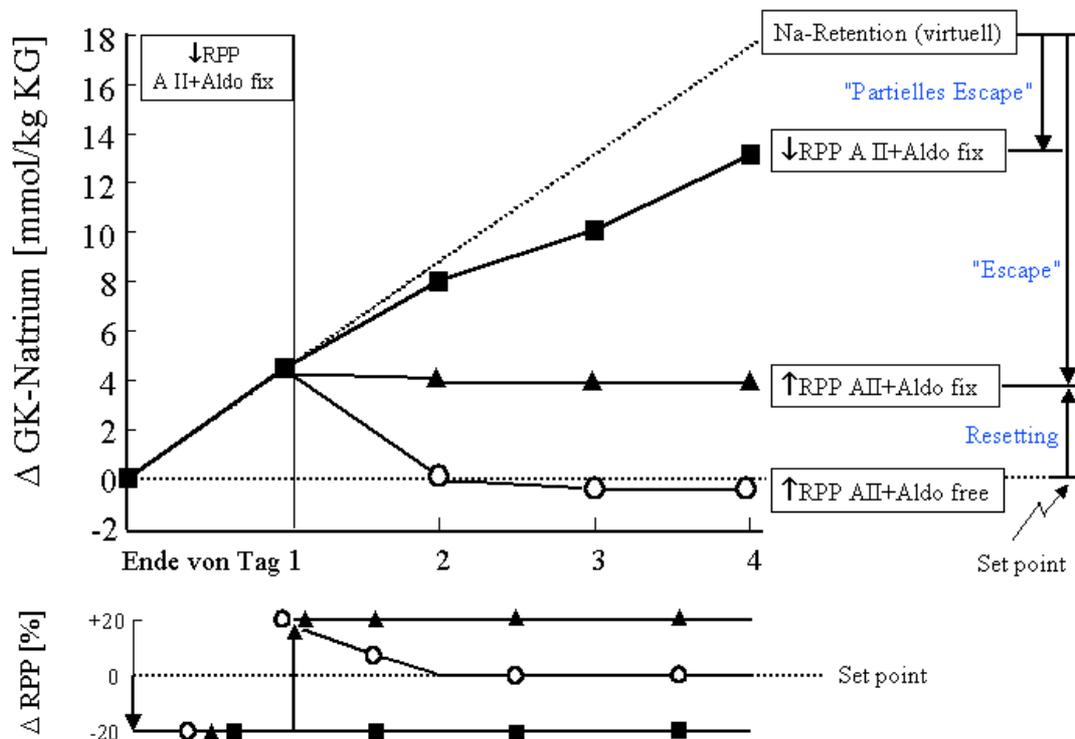


Abb. 8: Einfluss des „freigegebenen“ RPP (\uparrow RPP) und des RAAS auf die Kontrolle des GK-Natrium-Bestands.

Die Veränderungen im GK-Natrium über einen Zeitraum von vier Tagen sind für drei Protokolle im oberen Teil der Abbildung dargestellt (Na-Zufuhr $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{Kg} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$). Der untere Teil zeigt den renalen Perfusionsdruck während dieser Tage. Am ersten Versuchstag wurde er in allen Protokollen um 20 % erniedrigt. In den Protokollen „ \uparrow RPP A II+Aldo fix“ und „ \uparrow RPP A II+Aldo free“ wurde die Drosselung des RPP nach dem ersten Tag beendet, während sie im Protokoll „ \downarrow RPP A II+Aldo fix“ weiter fortbestand (näheres siehe Text). Ein Teil der Daten wurde der Veröffentlichung P12 entnommen (s. Anhang). Abbildung mit freundlicher Erlaubnis nach Reinhardt & Seeliger (2000).

¹ Ich danke Herrn Prof. Reinhardt und Dr. Seeliger für die Erlaubnis, Ergebnisse ihrer neuen Studie hier darstellen zu dürfen

Durch das Freigeben des renalen Perfusionsdrucks kam es in den Folgetagen zum Bilanzausgleich durch Wirkung der Drucknatriurese, ohne dass jedoch die bis zum Ende des ersten Tages retinierte Natriummenge ebenfalls wieder ausgeschieden worden wäre (Bilanzausgleich („Escape“) bei persistierend erhöhtem Natriumbestand) (Abb. 8). Beim *zweiten Protokoll* wurde kein Angiotensin II und kein Aldosteron infundiert und die Servokontrolle des reduzierten renalen Perfusionsdrucks ebenfalls nach dem ersten Tag beendet (\uparrow RPP AII+Aldo free-Protokoll) (Abb. 8). Diesmal kam es innerhalb von 24 Stunden zur Ausscheidung der am ersten Tag retinierten Natriummenge und gleichzeitig zum Bilanzausgleich (Abb. 8), d.h. der alte „set point“ des Natrium-Bestands wurde wiedergefunden.

4.2 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studien machen es somit wahrscheinlich, dass das GK-Natrium eine kontrollierte Variable ist. Zwei Faktoren spielen bei der Kontrolle des GK-Natriums eine wesentliche Rolle, die Aktivität des RAAS und der renale Perfusionsdruck. Ist nur eine dieser Komponenten gestört, kann sie durch die andere - was das Einstellen eines 24-Stunden Bilanzgleichgewichtes angeht - ausgeglichen werden, allerdings unter Inkaufnahme eines veränderten GK-Natriumbestands: Beim Mineralokortikoid-Escape scheint es vornehmlich die Drucknatriurese, beim Druck-Escape vornehmlich die endogene Unterdrückung des RAAS zu sein, die zum Ausgleich der Natrium-Tagesbilanzen führt. Wir konnten zeigen, dass ein um 20 % erniedrigter renaler Perfusionsdruck per se keine Natrium-retinierende Wirkung hat, sondern dass dieser Effekt durch die Stimulation des RAAS bei reduziertem Perfusionsdruck hervorgerufen wird, denn wird das Angiotensin-Aldosteron-System durch einen ACE-Hemmer geblockt und dann der renale Perfusionsdruck um 20 % reduziert, kommt es zu keiner Zunahme des Natrium- und Wasserbestandes (\downarrow RPP+Capto-Protokoll) [Boemke et al. 1995 (P9)]!

Beide Komponenten, der renale Perfusionsdruck und das RAAS, scheinen als Kompensationsmechanismen annähernd gleiche Potenz zu haben, wenn es darum geht, eine Zunahme des GK-Natrium- oder Wasserbestandes zu verhindern. Der Natrium-Bestand kann langfristig weder durch den renalen Perfusionsdruck noch durch das RAAS allein kontrolliert werden.

5 Einfluss der Stickoxid (NO)-Synthasehemmung auf die 24 h-Natrium- und Wasserbilanz:

Langzeitversuche mit und ohne reduzierten renalen Perfusionsdruck (P13)

Die Zielsetzung der nachfolgend beschriebenen Versuche war es, den Einfluß einer NO-Synthase (NOS)-Hemmung auf die Regelung des Natriumbestands zu spezifizieren.

Dem Stickoxid (NO) scheint eine wichtige Rolle als Bindeglied zwischen dem arteriellen Druck und dem Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt zuzukommen (Majid et al. 1993). Außerdem soll es eine wesentliche Rolle bei der druckabhängigen Reninfreisetzung spielen (Persson et al. 1993). In den bislang vorliegenden Studien werden die Effekte des NO auf die Wasser- und Elektrolytausscheidung jedoch keineswegs einheitlich beurteilt: Einige Studien beschreiben nach NOS-Hemmung eine verminderte Natriumausscheidung (Fortepianti et al. 1999; Manning et al. 1994; Salazar et al. 1992), andere fanden eine Natriurese (Bayliss et al. 1999; Khraibi et al. 1994; Qiu et al. 1998) und wieder andere fanden eine unveränderte Natriumausscheidung (Gonzales et al. 1998; Hu et al. 1994; Navarro et al. 1994). Ähnlich widersprüchlich äußert sich die Literatur hinsichtlich einer möglichen Aktivierung des RAAS durch NO (Beierwaltes 1997; Bosse et al. 1995; Persson et al. 1993; Shesely et al. 1996). Übereinstimmung scheint lediglich dahingehend zu herrschen, dass eine Hemmung der NOS den renalen Blutfluss vermindert (Baumann et al. 1992; Broere et al. 1998; Qiu et al. 1998; Manning et al. 1994).

Die unterschiedlichen Ergebnisse können z.B. bedingt sein durch Speziesunterschiede, unterschiedliche Dosierungen des NOS-Inhibitors, Begleiteffekte einer Anästhesie und durch den unterschiedlichen Zeitverlauf verschiedener Parameter, die insgesamt einen Vergleich von Resultaten aus Kurzzeitexperimenten (einige Stunden) mit denen aus Langzeitstudien (mehrere Tage) erschweren oder unmöglich machen.

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, ist einer der wesentlichen Determinanten des GK-Natriumbestandes der renale Perfusionsdruck. Der renale Perfusionsdruck kann steigen, wenn es durch die Hemmung der NOS zu einer generalisierten Vasokonstriktion kommt. Es war daher in Vorversuchen nötig, eine Dosierung des NOS-Inhibitors zu finden, die gerade noch keine blutdrucksteigernde Wirkung zeigte, andererseits aber die Wirkung der NOS-Inhibition anhand anderer Parameter (z.B. dem Abfall der Herzfrequenz während NOS-Inhibition) erkennen ließ. Dies gelang durch eine kontinuierliche Infusion des NOS-Inhibitors L-N^o-Nitroarginin

(Sigma) in einer Dosierung von $3 \mu\text{g} \cdot \text{kg KG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Des Weiteren wurden die Diät und die Umweltbedingungen so standardisiert und kontrolliert, wie im ersten Abschnitt beschrieben (s. S. 9-13). Dadurch wurde u.a. eine weitgehend gleichartige präexperimentelle Aktivität des RAAS bei allen Versuchshunden sichergestellt.

Vier Hundegruppen mit jeweils sieben Hunden wurden in vier Protokollen untersucht:

1. Vier Tage Zeitkontrolle (*Kontrolle*);
2. Vier Tage mit kontinuierlicher Infusion des NOS-Inhibitors L-N^o-Nitroarginin in einer Dosierung von $3 \mu\text{g} \cdot \text{kg KG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (*LN-Gruppe*);
3. Vier Tage mit - im Vergleich zu den Kontrolltagen - um 20 % reduziertem RPP (*rRPP-Gruppe*);
4. Vier Tage mit kontinuierlicher Infusion des NOS-Inhibitors L-N^o-Nitroarginin wie in Protokoll 2, in Kombination mit einem um 20 % im Vergleich zu Kontrolltagen reduzierten RPP (*rRPP + LN Gruppe*).

In den Protokollen 3 und 4 wurde die servo-kontrollierte Reduktion des renalen Perfusionsdrucks als ein natrium-retinierender Stimulus eingesetzt. Unter rRPP-Bedingungen kommt der gesunde, in seinen Regelfunktionen anderweitig nicht eingeschränkte Hund innerhalb von 24-48 Stunden in ein neues Einfuhr/Ausfuhr-Gleichgewicht auf einem höheren GK-Natrium-Bestand (Druck-Escape, s. S. 24-28). Die Protokolle 3 und 4 sollten zeigen, ob sich die Geschwindigkeit und die Effektivität des Druck-Escapes bei NOS-Inhibition ändern würde, um auf diese Weise eine Aussage zum Stellenwert des NO für das Zustandekommen des Druck-Escapes zu machen.

5.1 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie legen nahe, dass NO einen druckunabhängigen natrium-retinierenden Effekt hat, da es unter der kontinuierlichen Infusion des NOS-Inhibitors am zweiten und dritten Untersuchungstag zu einer negativen Natriumbilanz kam (d. h., die Natriumausscheidung bei den LN-Hunden war größer als bei den Kontrolltieren), ohne dass der arterielle Blutdruck angestiegen wäre (Abb. 9). Da die glomeruläre Filtrationsrate unverändert blieb, muss die gesteigerte Natriumausscheidung auf tubuläre Prozesse zurückzuführen sein. Mikropunktions- und Mikroperfusionsstudien zeigten jedoch

uneinheitliche Ergebnisse bezüglich eines *direkten* Effekts von NO auf tubuläre Transportprozesse (Eitle et al. 1998; Wang 1997).

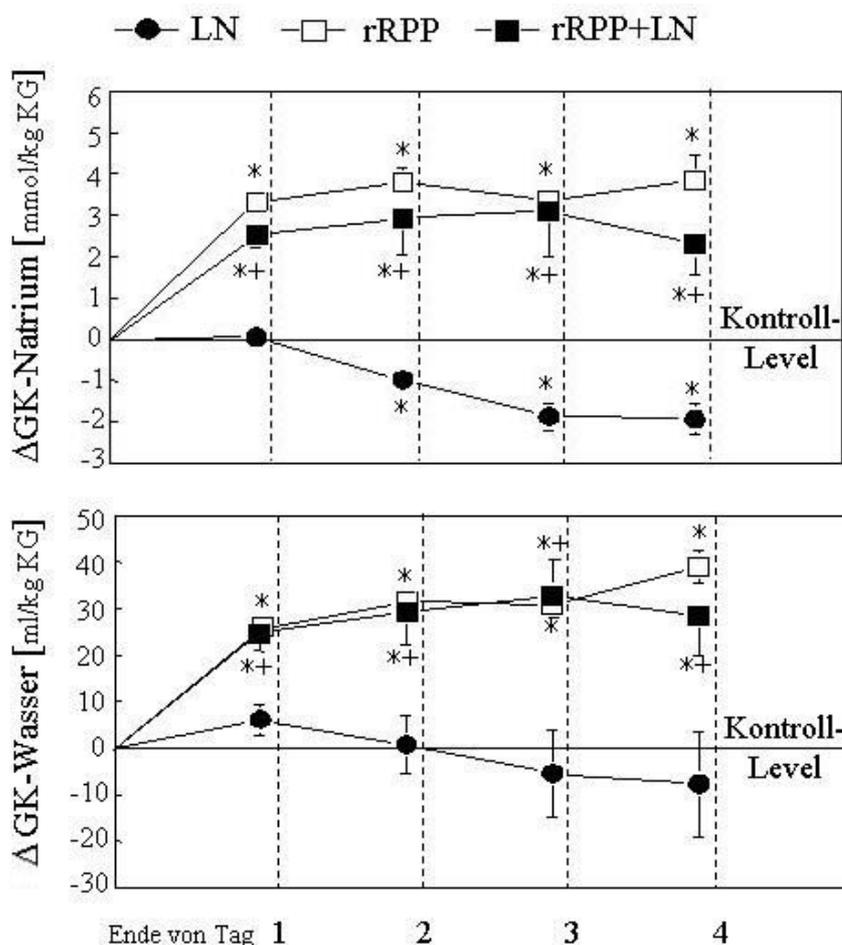


Abb. 9:

Veränderungen im GK-Natrium- (oben) und GK-Wasserbestand (unten), dargestellt als kumulative Natrium- und Wasserbilanzen im Vergleich zu Kontrolltagen. Protokolle: vier Tage kontinuierliche Infusion des NOS-Inhibitors L-N^o-Nitroarginin (LN); vier Tage reduzierter renaler Perfusionsdruck (rRPP); vier Tage reduzierter renaler Perfusionsdruck plus LN Infusion (rRPP+LN). Mittelwert \pm SEM (n = 7 Hunde pro Protokoll).

*, signifikant gegen Kontrolle; +, signifikant gegen LN; §, signifikant gegen rRPP (ungepaarter t-Test mit Bonferroni-Adjustierung für multiple Vergleiche). Abbildung modifiziert nach Seeliger et al. 2001 (P13).

Die gesteigerte Natriumausscheidung wäre jedoch auch über *indirekte* Mechanismen zu erklären, nämlich durch die unter dem NOS-Inhibitor niedrigeren PRA und Aldosteronkonzentrationen. Die Aldosteronkonzentration hatte in der LN-Gruppe genau am zweiten und dritten Tag ihr Minimum, also genau an den Tagen, an denen auch die Natriumausscheidung am stärksten war (Abb. 9 und 10). Eine niedrige PRA während NOS-Inhibition wurde auch in einer Kurzzeitstudie an Hunden beschrieben (Persson et al. 1993), während dies in Langzeitstudien durchaus nicht immer gesehen wurde (Gonzales et

al. 1998; Manning et al. 1997; Salazar et al. 1992). Einer der Gründe hierfür könnte sein, dass die PRA-Werte Schwankungen oder Veränderungen unterworfen sind, die nur erfasst werden können, wenn die PRA in regelmäßigen Intervallen über längere Zeiträume bestimmt wird (Qiu et al. 1998). Es wäre z.B. denkbar, dass die PRA-Werte nach anfänglichem Abfall unter NOS-Inhibition wieder steigen, weil die initiale Natriurese zu einer Reduktion des GK-Natriums führt, auf die der Organismus mit einer Stimulation des RAAS reagiert.

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) stieg bereits am ersten Tag nach NOS-Inhibition stark an und blieb vom zweiten bis vierten Tag auf diesem erhöhten Niveau weitgehend konstant. Da der Blutdruck während des gesamten Untersuchungszeitraums unverändert blieb, ist dieser Anstieg am ehesten auf einen erhöhten atrialen Druck in Folge einer L-N^o-Nitroarginin-bedingten Venokonstriktion zurückzuführen. Eine direkte Beziehung zwischen ANP Konzentrationen und Natriumausscheidung bestand nicht. Das ANP war auch an Tagen erhöht, an denen keine erhöhte Natriumausscheidung nachweisbar war (erster und vierter LN-Tag).

Im Gegensatz zu älteren Studien, die unter NOS-Inhibition vorwiegend eine natriumretinierende Wirkung sahen (Majid et al. 1993; Romero et al. 1992; Salazar et al. 1992; Siragy et al. 1992), kommen neuere Studien - wie auch unsere - eher zu einem gegenteiligen Ergebnis (Alvarez et al. 2000; Gonzales et al. 1998; Granger et al. 1999; Manning et al. 1997; Qui et al. 1998).

In Bezug auf das Druck-Escape-Phänomen stellten wir fest, dass eine NOS-Inhibition den Prozess der Wiedereinstellung einer ausgeglichenen Natriumbilanz weder beschleunigt noch verlangsamt. Dieser Befund ähnelt denen von Granger et al. (1999). Diese untersuchten wache Hunde mit chronisch erhöhten Aldosteronplasmaspiegeln (Aldosteroninfusion). Sie zeigten, dass eine NOS-Inhibition den zeitlichen Verlauf des Mineralokortikoid-Escapes nicht verändert. Da der renale Perfusionsdruck in der Studie von Granger et al. (1999) jedoch nicht konstant gehalten wurde sondern stieg, ist nicht auszuschließen, dass die unveränderte Natriumbilanz - wenigstens zum Teil - auf eine Erhöhung des renalen Perfusionsdruckes im Sinne einer Drucknatriurese zurückzuführen sein könnte (Granger et al. 1999; Hall et al. 1984). Unsere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass das Druck-Escape in den LN + ↓RPP Hunden - so wie in den ↓RPP Hunden - vorwiegend durch einen Abfall der Plasma-Aldosteronpiegel zustande kommt.

Bemerkenswerterweise waren jedoch auch die PRA-Spiegel unter NOS-Inhibition deutlich vermindert. Dies könnte das Druck-Escape in den rRPP+LN Hunden zusätzlich gefördert haben (Abb. 10).

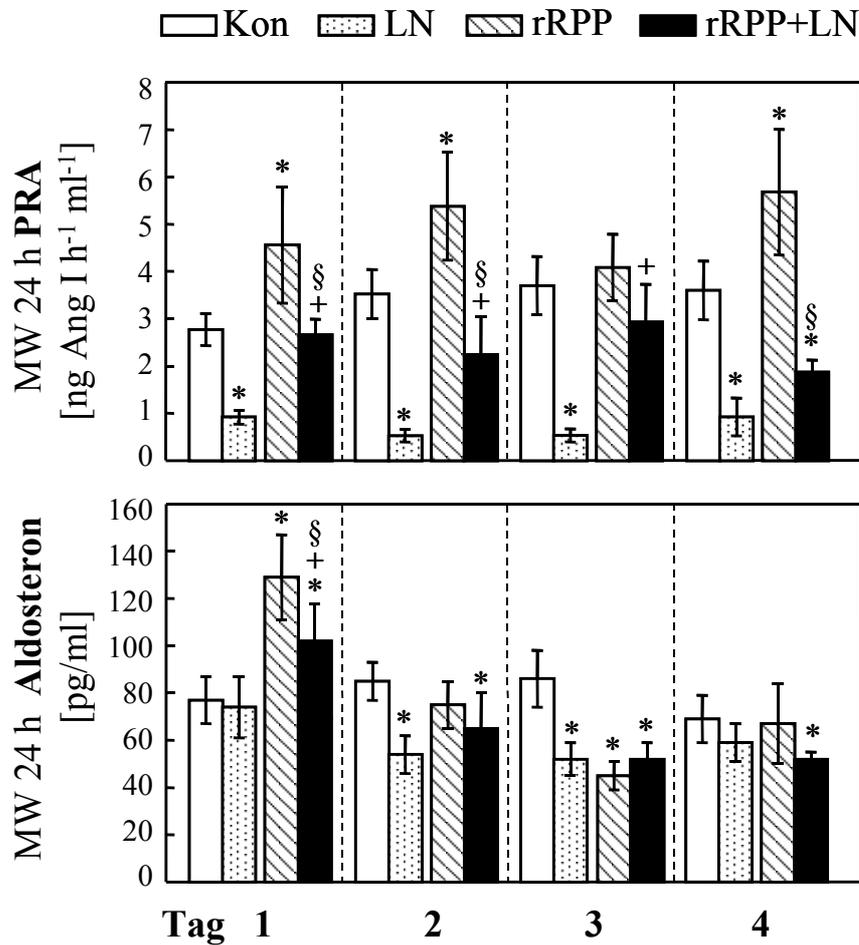


Abb. 10:

24-Stunden Mittelwerte (MW) der Plasma-Renin-Aktivität (PRA; oben) und des Plasma Aldosterons (unten) (errechnet aus sechs Plasmaprobe n pro Tag, entnommen in vierstündigen Intervallen). Mittelwerte \pm SEM (n = 7 Hunde pro Protokoll). Die Signifikanzsymbole werden in Abb. 9 erklärt. Abbildung modifiziert nach Seeliger et al. 2001 (P13).

Wegen des überraschenden, bisher nach unserem Wissen noch nicht beschriebenen Befundes, soll die Beziehung zwischen PRA-Werten und dazugehörigen Aldosteronkonzentrationen mit und ohne NOS-Inhibition abschließend näher besprochen werden.

Unsere Untersuchungen zeigen - im Vergleich zu den *nicht* mit L-N^o-Nitroarginin behandelten Hunden - eine deutlich schwächere Reninliberierung (niedrigere PRA-Werte) in den Protokollen, in denen der NOS-Inhibitor eingesetzt wurde, d.h. mit und ohne reduziertem renalen Perfusionsdruck. Wobei die Hunde *mit* reduziertem renalen

Perfusionsdruck jeweils höhere PRA-Werte aufwiesen als die ohne reduzierten renalen Perfusionsdruck. Die Aldosteronwerte fielen nach NOS-Inhibition jedoch keineswegs in gleicher Stärke wie die PRA-Werte (Abb. 10). Mit anderen Worten: Das Verhältnis Plasma-Aldosteronkonzentration / PRA erhöhte sich in den NOS-inhibierten Hunden beachtlich. Es kann daher spekuliert werden, dass die NOS-Inhibition die Angiotensin II-abhängige Aldosteronsekretion verstärkt. Hinweise darauf, dass umgekehrt NO die Steroidsynthese supprimieren kann, lassen sich aus Befunden anderer Arbeitsgruppen ziehen. So zeigen *in-vitro*-Untersuchungen, dass die Steroidbildung durch eine direkte Interaktion von NO mit der Hämgruppe des Cytochrom P450 Enzyms gehemmt wird (Hanke et al. 1998). An kultivierten Zona glomerulosa Zellen der Nebenniere soll sowohl die basale als auch die Angiotensin II-induzierte Aldosteronsynthese durch NO vermindert werden können (Hanke et al. 1998, Hanke et al. 2000). Nach langfristiger NOS-Inhibition in *in-vivo* Studien an Ratten wurde zudem eine vermehrte Expression von Angiotensin II-Typ 1 (AT₁)-Rezeptoren gefunden (Usui et al. 1998), wobei unklar bleibt, ob dieser Effekt durch die NOS-Inhibition bedingt war oder durch eine mögliche Verminderung des GK-Natriums (negative Natriumbilanz bei chronischer NOS-Inhibition). Des weiteren liegen aus *in-vitro*-Studien Hinweise dafür vor, dass NO die Aktivität des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms hemmen könnte (Ackermann et al. 1998). Ob die Verstärkung der „Signal“-Übertragung vom Renin zum Aldosteron unter NOS-Inhibition mit einer Zunahme der AT₁-Rezeptoren und einer gesteigerten Umwandlungsrate von Angiotensin I in Angiotensin II zu tun hat, ist nicht klar. Unklar bleibt auch, über welchen Pfad es genau zu der Reduktion der PRA kommt.

5.2 Zusammenfassung und Schlussfolgerung:

NOS-Inhibition und RAAS

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der NOS - bei unverändertem renalen Perfusionsdruck - zu einer transient (zweiter und dritter Tag) negativen Natriumbilanz führt (Abb. 9). Wird der renale Perfusionsdruck langfristig um ca. 20 % vermindert, kommt es zum Druck-Escape-Phänomen, das durch die NOS-Inhibition weder in seinem zeitlichen Verlauf noch in der Menge des am ersten Tages retinierten Natriums und Wassers verändert wird. Mit und ohne NOS-Inhibition ist das Pressure Escape von einer Verminderung des Plasma-Aldosterons begleitet. Auffallend war, dass die PRA-Werte bei den Hunden während NOS-Inhibition durchweg niedriger waren als bei solchen mit

intaktem NO-System (Abb. 10). Der Aldosteron / PRA Quotient war unter NOS-Inhibition deutlich größer als in den jeweiligen Protokollen ohne NOS-Inhibition.

Dies ist ein eindrucksvolles Beispiel dafür, dass deutliche hormonelle Veränderungen - wie z.B. der Anstieg des Aldosteron / PRA Quotienten unter NOS-Inhibition - auftreten können, ohne dass Veränderungen einer Variablen, die üblicherweise in enger Beziehung zu den Hormonen Renin und Aldosteron steht - wie z.B. der Natriumausscheidung während rRPP mit und ohne NOS-Inhibition – gemessen werden. So mag das Endresultat das gleiche sein, der Hintergrund, vor dem dies geschieht - d. h. das Wirken extra- und intrazellulären Rückkopplungs- und Regelsysteme - jedoch ein völlig anderer.

6 Hypoxie und RAAS

Kurzzzeitversuche an wachen Hunden (P14, P15)

Während länger andauernder Hypoxie kommt es zu einer Abnahme des Natrium- und Wasserbestandes. Allgemein bekannt dürfte hierfür der Terminus „Höhendiurese“ sein. Das heißt, der Organismus gibt mit zunehmender Höhe und damit abnehmenden inspiratorischen O₂-Partialdrücken einen Teil seines Natrium- und Wasserbestandes auf. Das wirft die Frage auf: Welche Rolle spielt das RAAS unter den Bedingungen der Hypoxie?

In früheren Studien, die wir an wachen, ruhig auf dem Versuchstisch liegenden, trainierten Hunden unter standardisierten Umgebungs- und Ernährungsbedingungen durchführten, fanden wir unter Hypoxie regelmäßig einen Abfall der PRA sowie der Plasma-Angiotensin II- und -Aldosteronkonzentration [Krebs et al. 1999a (P14)].

Betrachtet man die Literatur, dann finden sich sowohl bei Studien am Menschen als auch am Tier bezüglich der PRA widersprüchliche Befunde (Keynes et al. 1982; Neylon et al. 1996; Skwarski et al. 1998). Häufig war jedoch weder die Wasser- noch die Natriumzufuhr standardisiert (Skwaski et al. 1998), noch wurde zwischen Befunden in Ruhe und unter Belastung unterschieden (Neylon et al. 1996; Zaccaria et al. 1998).

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen untersuchten wir, ob der PRA-Abfall unter Hypoxie durch Adenosin vermittelt sein könnte [Höhne et al. 2001 (P15)]. Adenosin ist ein Nukleosid, dessen Konzentration unter Hypoxie und Hypoperfusion ansteigt (Shryock & Belardinelli 1997). Adenosin hemmt die Adenylcyclase über den A₁-Rezeptor auf den juxtaglomerulären Zellen der Niere und kann so die Reninliberierung reduzieren (cAMP Pfad) (Jackson 1991; Weaver & Reppert 1992). In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung zeigen bereits Ergebnisse aus alten Untersuchungen (Tagawa & Vander 1970), dass eine Adenosininfusion in der Lage ist, die Reninfreisetzung zu verringern. Neben den A₁-Rezeptoren gibt es noch die A₂ und die A₃-Rezeptoren. Im Gegensatz zu den A₁-Rezeptoren verstärkt die Stimulation der A₂-Rezeptoren die Reninfreisetzung aus der Niere (Churchill & Churchill 1985). Eine Beziehung zwischen A₃-Rezeptoren und RAAS konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Ziel unserer Untersuchungen war es, den A₁-Rezeptor, der für die Hemmung der Reninliberierung verantwortlich ist, möglichst spezifisch zu hemmen. Wenn Adenosin für den Abfall der PRA-Spiegel unter Hypoxie mitverantwortlich sein sollte, dann sollte die PRA-Konzentration in den A₁-blockierten Hunden unter Hypoxie nicht abfallen.

6.1 Methodik

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen, handelt es sich bei den Hypoxieversuche um Kurzzeitversuche, die sich über einen Zeitraum von 3 Stunden erstreckten. Die Hunde wurden ca. 3 Wochen vor den Untersuchungen in Vollnarkose tracheotomiert (nach Dalgard et al. 1979 mit eigenen Modifikationen). Zur Vermeidung von Sekundärinfektionen wurde eine perioperative Antibiotikaphylaxe verabreicht. Das Bellen und Atmen wurde durch die Tracheotomie nicht behindert. So bald wie möglich wurden die Hunde trainiert, ruhig auf dem Versuchstisch zu liegen und über eine Trachealkanüle, die mit einem Beatmungsgerät verbunden war, spontan zu atmen.

Um das RAAS vor Beginn der Versuche gleichartig zu stimulieren, erhielten alle Hunde für die Dauer von fünf Tagen vor Versuchsbeginn eine standardisierte, natriumarme Diät ($0,5 \text{ mmol Na} \cdot \text{kg KG}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$). Dadurch wurden die PRA-Werte bereits präexperimentell auf ein höheres Niveau gebracht. Ein hypoxiebedingter Abfall der PRA-Werte kann so besser erkannt werden, als dies bei einer natriumreichen Diät mit supprimierter Reninliberierung der Fall wäre.

Wir wählten Theophyllin, um die A₁-Rezeptoren, die sich auf der Zellmembran befinden, zu blockieren. Da die Wirkungen des Methylxanthins Theophyllin dosisabhängig sind, war es wichtig, das Theophyllin in niedriger Dosis zu applizieren, um sicherzustellen, dass es die Zellwand nicht durchdringt und zu unerwünschten intrazellulären Effekten führt, wie z.B. einer Hemmung der Phosphodiesterase (Wells & Miller 1988; Jackson 1991; Williams 1987). Die in unseren Versuchen gemessenen Theophyllin-Plasmaspiegel von etwa 4 mg/l lagen weit unter den Plasmaspiegeln, bei denen mit intrazellulären Wirkungen zu rechnen ist (8-20 mg/l) (Hardman et al. 1996). Methodenkritisch sei hier angemerkt, dass - müssten wir die Versuche heute wiederholen - wir selektivere A₁-Rezeptor-Blocker wählen würden, z.B. 8-(Noradamantan-3-yl)-1,3-Dipropyl-Xanthin (KW-3902), um oben genannte Dosierungsprobleme von vornherein zu umgehen.

An den Versuchstagen wurde den wachen Hunden zunächst ein Blasenkatheter gelegt. Danach wurde eine Verweilkanüle in eine der Ellenbeugenvenen gelegt und nach Lokalanästhesie ein aortaler Katheter über die A. femoralis sowie ein Pulmonalarterienkatheter über die V. jugularis externa eingeführt. Nach Einsetzen der Trachealkanüle wurden die Hunde an das Beatmungsgerät angeschlossen, über das das normoxische und hypoxische Gasgemisch bei Spontanatmung des Hundes appliziert wurde. Danach hatten die Hunde ca. eine Stunde Zeit, sich an die Versuchsbedingungen zu adaptieren. Alle Hunde waren vor Versuchsbeginn äußerlich ruhig und viele schlummerten in der Hypoxiephase vor sich hin.

Protokolle. Jeder der acht Versuchshunde wurde in randomisierter Folge in zwei jeweils dreistündigen Protokollen untersucht:

1. *Kontrolle:* Die Hunde atmeten in der ersten Stunde Raumlufte (21 % O₂ und 79 % N₂; Normoxie) und in den beiden folgenden Stunden ein hypoxisches Gasgemisch mit einem O₂-Anteil von 10 % und einem Stickstoff-(N₂)-Anteil von 90 %. Der so erzielte inspiratorische O₂-Partialdruck entspricht in etwa dem in einer Höhe von 5000 Metern.
2. *Theophyllin-Protokoll:* Im Theophyllin-Protokoll erhielten die Hunden nach der ersten Stunde (Normoxie) zunächst für 30 min 3 mg/kgKG Theophyllin i.v. (loading dose), danach wurde die zweistündige Hypoxiephase begonnen, während der 0,5 mg Theophyllin · kg KG⁻¹ · h⁻¹ infundiert wurden.

6.2 Resultate und Diskussion

Es zeigte sich, dass der üblicherweise während Hypoxie beim wachen Hund zu beobachtende Abfall der PRA und der Plasma-Angiotensin-II-Konzentration durch den Adenosin-1-Rezeptorantagonisten verhindert wurde. Auf der anderen Seite fiel die Plasma-Aldosteron-Konzentration während Hypoxie unabhängig davon, ob Theophyllin infundiert wurde oder nicht (Abb. 11) [Höhne et al. 2001 (P15)].

Über die physiologische Bedeutung dieser Befunde kann nur spekuliert werden. Eine verminderte Angiotensin II Konzentration während Hypoxie könnte die Vasokonstriktion in den peripheren Gefäßabschnitten vermindern und so während Hypoxie zu einer besseren Gewebedurchblutung und Oxygenation des Gewebes führen. Außerdem könnten niedrigere Angiotensin II- und Aldosteronkonzentrationen - in Kombination und unabhängig voneinander - zu einer stärkeren Natrium- und Wasserausscheidung beitragen

und nachfolgend zu einer Hämokonzentration führen, diese kann die Gewebeoxygenation u. U. ebenfalls verbessern.

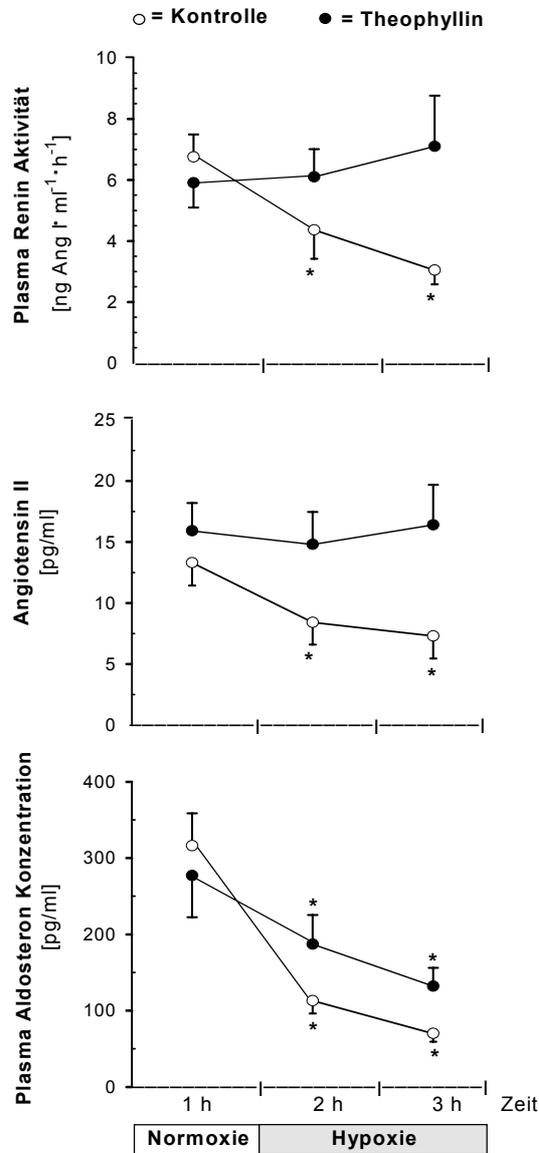


Abb. 11:

Plasma-Renin-Aktivität, Plasma-Angiotensin II- und -Aldosteron-Konzentration während einer Stunde Normoxie (FiO₂ 0,21) und zwei Stunden Hypoxie (FiO₂ 0,1).

Mittelwert ± SEM (n = 8), P < 0.05. *, signifikant gegen Normoxie, †, signifikant gegen Kontrolle.

Abbildung modifiziert nach Höhne et al. 2001 (P15).

Wie oben schon mehrfach angesprochen, spielt der renale Perfusionsdruck neben der Natrium- und Wasserzufuhr - die in unseren Experimenten streng kontrolliert wurde - eine entscheidende Rolle für die Höhe der PRA-Werte. Hätte der arterielle Blutdruck während

der Normoxieperiode beispielsweise unterhalb des Schwellenwertes für die druckabhängige Reninfreisetzung (ca. 89 mmHg bei wachen Hunden; Finke et al. 1983) gelegen, dann hätte der Anstieg des renalen Perfusionsdruckes während der Hypoxieperiode den Abfall der PRA mitverursachen können. Da die arteriellen Mitteldrucke bei unseren Hunden jedoch 5 bis 10 mmHg über diesem Schwellenwert lagen, ist der Blutdruckanstieg während der Hypoxieperiode wahrscheinlich *nicht* die Ursache für den Abfall der PRA.

Bei konstanter glomerulärer Filtrationsrate verdoppelte sich in unseren Versuchen die Wasser- und Kaliumausscheidung während der Hypoxiephase sowohl in den Kontroll- als auch in den Theophyllin-Experimenten, wohingegen die Natriumausscheidung sich nicht änderte. Wegen der diätetisch niedrigen Natriumzufuhr in unseren Hypoxie-Experimenten ist der Organismus wahrscheinlich bestrebt, Natrium einzusparen. Als begleitendes Kation für die renal vermehrt ausgeschiedenen Hydrogenkarbonat-Anionen wird deshalb wahrscheinlich statt Natrium vermehrt Kalium eingesetzt. Zusätzlich ist denkbar, dass die erhöhte Wasser- und Kaliumausscheidung eine Begleiterscheinung der renalen Kompensation der akuten respiratorischen Alkalose ist. Die respiratorische Alkalose entwickelt sich wegen des verstärkten Atemantriebs unter Hypoxie.

Zu Änderungen der Konzentrationen des atrialen natriuretischen Peptids und antidiuretischen Hormons kam es in unseren Protokollen nicht. Die beiden Hormone haben deshalb wahrscheinlich sowohl an der Suppression des RAAS, als auch an den beobachteten renalen Veränderungen keinen oder nur einen unwesentlichen Anteil. Da auch die Konzentration des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms in beiden Protokollen gleich war, kann auch dies nicht die wesentliche Ursache für die Veränderungen der Angiotensin II- und Aldosteronkonzentration gewesen sein.

Wahrscheinlich sind die in beiden Protokollen erniedrigten Aldosteronkonzentrationen (Abb. 11) direkt durch die von Brickner et al. (1992) beschriebene verminderte Aktivität der 18-Hydroxylase während Hypoxie bedingt. Die 18-Hydroxylase beschleunigt in den Zona-Glomerulosa-Zellen der Nebennierenrinde die Konversion von Kortisol in Aldosteron. So wäre zu erklären, dass die Aldosteronkonzentration unter Theophyllin-infusion fällt, obwohl das PRA und die Angiotensinkonzentrationen konstant bleiben.

Die erniedrigten PRA and Angiotensin II Spiegel scheinen hingegen - in noch nicht geklärter Weise - mit dem A₁-Rezeptor und dem Adenosin in Verbindung zu stehen.

Zusätzlich zum Adenosin wären zwei weitere Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen, die sowohl PRA als auch Aldosteron beeinflussen und das Verhältnis beider zueinander u. U. verändern können: das Endothelinsystem und das NO.

Bezüglich des Endothelins konnte gezeigt werden, dass alle drei Endotheline (ET), ET-1, ET-2 und ET-3, *in-vitro* das Reninsystem unterdrücken können (Moe et al. 1991; Rakugi et al. 1988; Scholz et al. 1995). An Ratten, die einer chronischen normobaren Hypoxie (10 % O₂ über vier Wochen) ausgesetzt waren und denen der ET_A-Rezeptor-Blocker LU-135252 (Knoll AG, Ludwigshafen, Deutschland) verabreicht wurde, stieg die Renin-Gen-Expression stark an (ET-1 mRNA[↑]). Aus diesen Befunden könnte im Umkehrschluss geschlossen werden, dass - wenigstens unter chronisch hypoxischen Bedingungen - die renale Renin-Gen-Expression über einen ET_A-Rezeptor-abhängigen-Weg suppprimiert werden kann (Schweda et al. 2000).

Es wäre auch vorstellbar, dass die Kopplung zwischen PRA bzw. Ang II und NO über das Endothelin vermittelt wird. Dass eine Beziehung zwischen dem RAAS und dem NO-System besteht, darauf deuten u.a. unsere Versuche mit und ohne Verminderung des renalen Perfusionsdrucks und gleichzeitiger NOS-Inhibition hin: Deutlich reduzierte PRA-Werte und eine auffällige Erhöhung des Aldosteron/PRA-Verhältnisses nach NOS-Inhibition.

7 Natrium- und Wasserretention bei Beatmung mit positiv-end-expiratorischem Druck (PEEP): Rolle des RAAS und des sympathischen Nervensystems der Niere (P16, P17)

Eine Natrium- und Wasserretention, d.h. eine Erhöhung des GK-Natrium- und Wasserbestandes, wird häufig unter kontrollierter maschineller Beatmung (CMV = controlled mechanical ventilation) beobachtet, besonders wenn diese mit positiv end-expiratorischem Druck (PEEP) durchgeführt wird. Wir untersuchten, ob und in welchem Ausmaß das sympathische Nervensystem der Niere und das RAAS an dieser Natrium- und Wasserretention beteiligt ist.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die durch CMV und PEEP-Beatmung hervorgerufenen hämodynamischen Veränderungen, wie z.B. die Verminderung des venösen Rückflusses, der Abfall des transmuralen Vorhofdrucks, des Herzzeitvolumens und arteriellen Drucks (Priebe et al. 1981), natrium- und wasserretinierende Hormone wie das antidiuretische Hormon (ADH), Angiotensin II und das Aldosteron stimulieren können (Kaczmarczyk et al. 1992, Kaczmarczyk et al. 1993). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an wachen Hunden weisen jedoch darauf hin, dass die hämodynamische und hormonelle Antwort auf CMV und PEEP u.a. stark vom Volumenstatus der Hunde abhängt. Bei expandiertem Extrazellulärvolumen (EZV) steigen weder das ADH, noch Ang II oder Aldosteron an (Rossaint et al. 1992). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass das RAAS bei zunehmender extrazellulärer Expansion supprimiert werden sollte. Bleiben die Hormonspiegel gleich - wie bei den EZV-expandierten Hunden - so kann dies als ein *indirektes* Zeichen einer hormonellen Stimulation gedeutet werden.

Ein bedeutende Rolle für die unter CMV mit PEEP zu beobachtende Natrium- und Wasserretention scheint auch der zentrale Venendruck und damit der Blutdruck in der V. renalis zu spielen (Rossaint et al. 1993). Volumenexpandierte wache Hunde, deren Blutdruck in der V. cava inferior mit einer Kompressionsmanschette genau auf den Druck gebracht wurde, der auch während CMV mit PEEP-Beatmung zu beobachten ist, zeigten eine Natrium- und Wasserretention, die der unter CMV mit PEEP-Beatmung äquivalent war, ohne dass es dabei zu Änderungen des ADH, des Aldosterons oder natriuretischen Peptids gekommen wäre (Rossaint et al. 1993).

Neben der Stimulation Natrium- und Wasser retinierender hormoneller Systeme führen die hämodynamischen Beatmungseffekte auch zum „unloading“ von kardio-pulmonalen-Rezeptoren im Niederdrucksystem und von Barorezeptoren im Hochdrucksystem, deren Impulse ans ZNS weitergeleitet werden (Afferenzen). Als Reaktion kann es u.a. zu Änderungen der renalen sympathischen Nervenaktivität (Efferenzen) kommen. Die postganglionären sympathischen Fasern erreichen die Niere entlang der Nierenarterie und enden an den glatten Muskelzellen der afferenten und efferenten Arteriole. Nervenfasern befinden sich auch am proximalen und distalen Tubulus, dem dicken aufsteigenden Anteil der Henle-Schleife und am juxtaglomerulären Apparat. Der Neurotransmitter ist Noradrenalin.

Es ist bekannt, dass im Bereich der basalen renalen sympathischen Nervenaktivität die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und der renale Blutfluß (RBF) unverändert bleiben, während sie bei starker Stimulation abnehmen. Als weitere Mechanismen der Natrium- und Wasserretention bei gesteigerter renaler sympathischer Aktivität werden vermutet: eine gesteigerte Na/K-ATPase-Aktivität der basolateralen Membran, ein Abfall des Ultrafiltrations-Koeffizienten (K_f) und eine gesteigerte Reninfreisetzung (ausführliche Literatur zum oben Gesagten bei Kopp & DiBona 1995).

Unsere nachfolgend beschriebenen Versuche wurden wiederum an *wachen*, trainierten Hunden durchgeführt. Beatmungsstudien an wachen Hunden sind einmalig in der Literatur, alle älteren Beatmungsstudien an Hunden wurden in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Diesen Untersuchungen war zu entnehmen, dass PEEP-Beatmung zu einem Anstieg der Plasma-Katecholamine und zu einem Anstieg der sympathischen Nervenaktivität im Allgemeinen führt (Chernow et al. 1986). Ergebnisse, die an anästhesierten Tieren gewonnen wurden, sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da sie stark durch die Art und die Tiefe der Anästhesie sowie durch während der Experimente vorgenommene chirurgische Maßnahmen beeinflusst werden können. Die daraus resultierenden hämodynamischen, nervalen und/oder humoralen Wirkungen können die Nierenfunktion unabhängig von der PEEP-Beatmung im Sinne einer Retention verändern und zu einer beatmungsunabhängigen Stimulation des sympathischen Nervensystems führen (Cannon et al. 1966; Keck et al. 1973; Kopp & DiBona 1995).

Unsere Fragestellung im einzelnen war:

1. Scheiden renal denervierte wache Hunde unter PEEP-Beatmung mehr Natrium und Wasser aus als intakte?
2. Gibt es dabei Unterschiede zwischen Hunden mit expandiertem und solchen ohne expandierten Extrazellulärraum?
3. Wie verhalten sich die Hormonspiegel bei renal-denervierten und intakten Hunden?

7.1 Methodik

Nach Anlage einer permanenten Tracheotomie (s. S. 37) wurden die Hunde über mehrere Wochen nicht nur daran gewöhnt, spontan im CPAP-Modus am Beatmungsgerät zu atmen, sondern sich auch vom Beatmungsgerät kontrolliert mit PEEP beatmen zu lassen. Dies gelingt erstaunlich problemlos, wenn die Atemfrequenz und das Atemzugvolumen so gewählt werden, wie es der individuelle Hund in der Spontanatemphase im CPAP-Modus vorgibt.

Diät: Die Hunde wurden bereits fünf Tage vor Versuchsbeginn mit einer standardisierten Diät versorgt, deren Natriumgehalt „normal“ war ($2,5 \text{ mmol Na} \cdot \text{kg Kg}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$, näheres s. S. 10). Damit wurde die Aktivität des RAAS bei allen Hunden auf ein vergleichbares Niveau gebracht. Auch dies ist ein wesentlicher Punkt, der in anderen Untersuchungen nicht oder nur unzureichend berücksichtigt wurde.

Protokolle: Jeder der acht Hunde wurde in allen vier Protokollen randomisiert untersucht: Während aller Versuche atmeten die Hunde zunächst für eine Stunde spontan im CPAP-Modus (kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck $4 \text{ cm H}_2\text{O}$), danach für zwei Stunden im PEEP-Modus (CMV mit einem PEEP von $15\text{-}17 \text{ cm H}_2\text{O}$, so dass ein mittlerer Atemwegsdruck von $20 \text{ cm H}_2\text{O}$ resultierte) und abschließend wiederum für eine Stunde im CPAP-Modus. Die FiO_2 betrug immer $0,21$.

Protokoll 1: Nieren innerviert; nicht expandierter Extrazellulärraum: Hunde seit letzter Nahrungsaufnahme am Vortag um 14 Uhr nüchtern, keine Infusion einer Vollelektrolytlösung während der Versuche. Dieses Prozedere diente dazu, die Natrium- und Wasser-retinierenden Systeme präexperimentell zu stimulieren.

Protokoll 2: Nieren innerviert; expandierter Extrazellulärraum: Zur Expansion des Extrazellulärraumes wurden $0,5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ einer Vollelektrolytlösung (Ionosteril[®], Braun Melsungen, Deutschland) mit Beginn der ersten CPAP-Periode infundiert (entspricht ca. 450 ml/h).

Nach den ersten beiden Protokollen wurden die Hunde in Allgemeinanästhesie chirurgisch bilateral renal denerviert [Details in Boemke et al. 1998 (P16)] und 14-21 Tage später die Protokolle 3 und 4 ebenfalls in randomisierter Folge durchgeführt:

Protokoll 3: Nieren denerviert, nicht expandierter Extrazellulärraum;

Protokoll 4: Nieren denerviert, expandierter Extrazellulärraum.

Es ist bekannt, dass die renale Denervation akut, d.h. in den ersten Stunden bis Tagen, zur sog. Denervationsdiurese führen kann. Das untersuchungsfreie Intervall von 14-21 Tagen nach renaler Denervation wurde daher in jedem Fall eingehalten. Andererseits durfte nicht zu lange mit der Fortsetzung der Protokolle gewartet werden, da ansonsten mit einer Reinnervation der Nieren gerechnet werden musste. Es war daher notwendig, die Vollständigkeit der Denervation durch die Bestimmung der Katecholamine im Nierengewebe am Ende der Versuchsserien, d.h. 3-4 Wochen nach der renalen Denervation, nachzuweisen. Hierzu wurden den Hunden in Vollnarkose Gewebestücke aus der Nierenrinde beider Nieren entfernt und mittels HPLC auf ihren Katecholamingehalt untersucht. Die Resultate wurden mit denen gesunder Beagle-Hunde verglichen, die exakt so ernährt worden waren, wie die Versuchshunde. Die Gewebe-Noradrenalin-Konzentration der denervierten Nieren betrug ca. 2 %, der Adrenalin-Gehalt ca. 6% der innervierten. Die renalen Denervationen dürften somit komplett gewesen sein.

Nach Abschluss aller Untersuchungen erfolgte der Tracheostomaverschluss und nach einer Ausheilungsperiode und abschließender tierärztlicher Untersuchung die Weitergabe der Hunde an ausgewählte private Halter.

7.2 Ergebnisse

MAP und GFR: Der mittlere Blutdruck der EZV-expandierten Hunde war höher als der der nicht expandierten. Kein Unterschied bestand hingegen zwischen intakten und renal denervierten Hunden, die den gleichen Volumenstatus hatten.

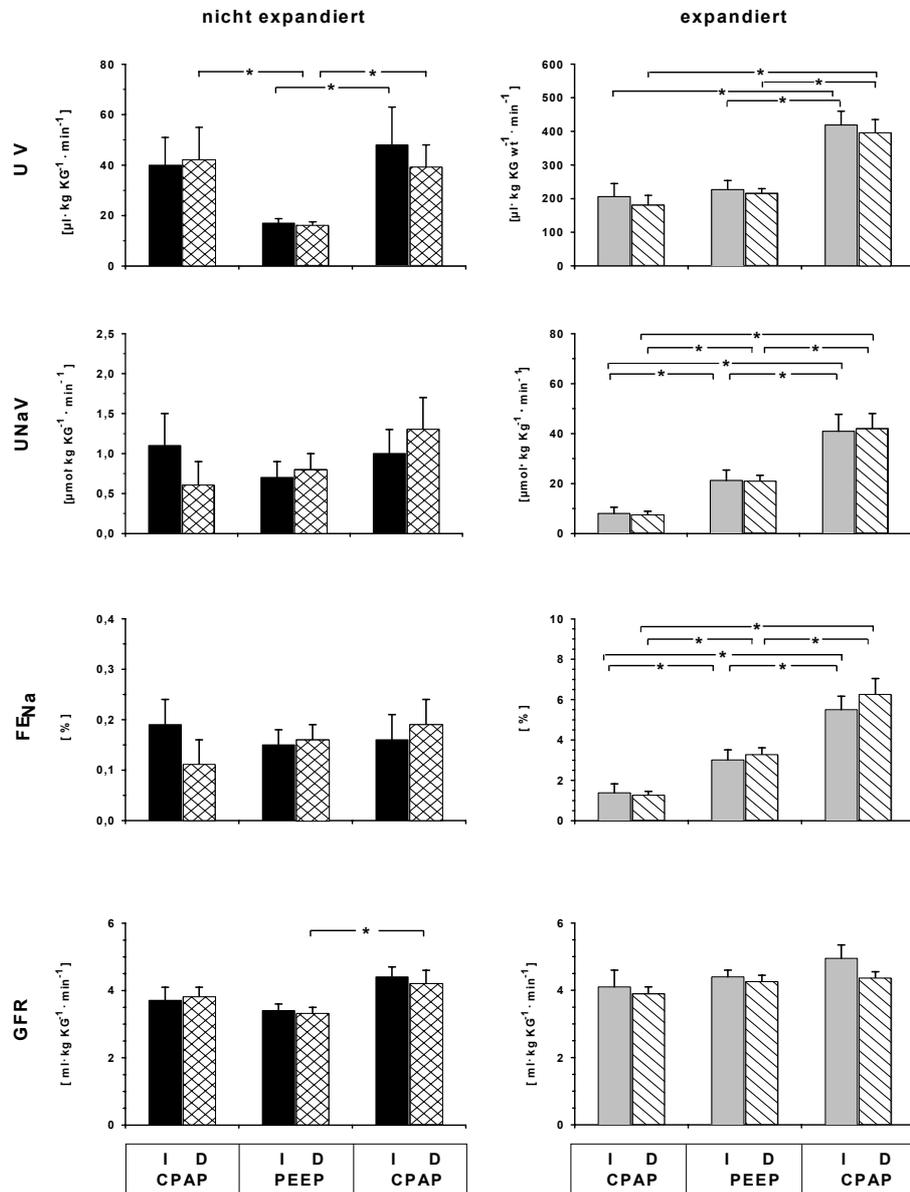
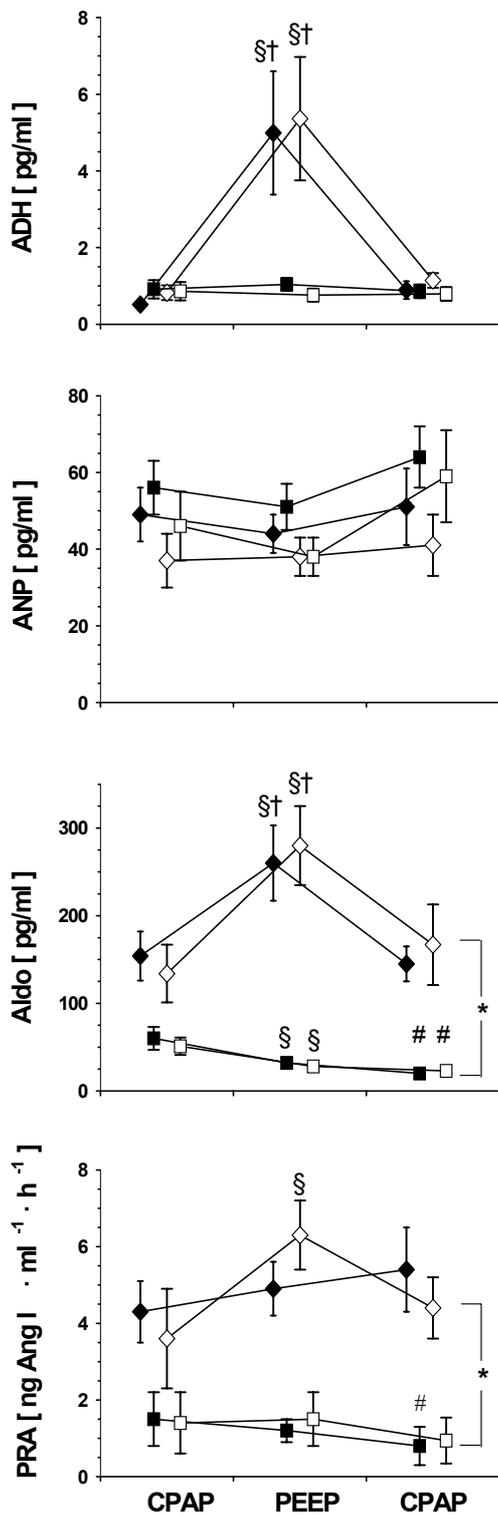


Abb. 12:

Urinausscheidung (UV), Natriumausscheidung (U_{NaV}), fraktionelle Natriumausscheidung (FENa %) und glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in extrazellulär expandierten und nicht expandierten Hunden, intakt (I) und renal denerviert (D), während 60 min Spontanatmung (CPAP), 120 min CMV mit PEEP und abschließend 60 min Spontanatmung (CPAP) ($n = 8$). Mittelwert \pm SEM, * signifikanter Unterschied ($P < 0.05$). Abbildung modifiziert nach Boemke et al. 1998 (P16).



Die GFR der intakten und renal denervierten Hunde war nahezu gleich und zeigte keinen Unterschied zwischen expandierten und nicht expandierten Hunden.

Natrium- und Wasserausscheidung: Das Harnvolumen und die Natriumausscheidung sind in Abb. 12 dargestellt. Intakte und renal denervierte Tiere verhalten sich gleichartig. Die Natrium- und Wasserausscheidung der EZV-expandierten Hunde war im Beobachtungszeitraum immer größer als die der nicht expandierten Hunde. Dennoch, betrachtet man die kumulative Bilanz, d.h. die Differenz zwischen Einfuhr und Ausfuhr über die Zeit, dann retinierten die EZV-expandierten Hunde beträchtliche Wasser- und Natriummengen (ca. 900 ml Wasser und 165 mmol Natrium während des vierstündigen Versuchs). Ein Einfuhr/Ausfuhr-Gleichgewicht wird sowohl unter CPAP als auch unter PEEP-Beatmung erst nach ca. 4 Stunden erreicht, wie aus Untersuchungen von Rossaint et al. (1992) am gleichen Hundemodell bekannt ist.

Abb. 13:

Antidiuretisches Hormon (ADH), atriales natriuretisches Peptid (ANP), Aldosteron (Aldo) und Plasma-Renin-Aktivität (PRA) während 60 min Spontanatmung (CPAP), 120 min CMV mit PEEP und abschließend 60 min Spontanatmung (CPAP) (n = 8). Mittelwert ± SEM; P < 0.05:

CPAP 1. Stunde gegen CPAP 4. Stunde; § CPAP 1. Stunde gegen PEEP;

† PEEP gegen CPAP 4. Stunde; * nicht expandiert gegen expandiert.

◆ nicht expandiert, intakt; ◇ nicht expandiert, renal denerviert;

■ expandiert, intakt; □ expandiert, renal denerviert

Hormone: Die wesentliche Determinante für den Hormonverlauf während der Beatmung war der Volumenstatus, nicht jedoch die Tatsache, ob der Hund renal-denerviert oder innerviert war. Die nicht-EZV-expandierten Hunde zeigten generell höhere Renin- und Aldosteronspiegel (Abb. 13).

Die Adrenalinpiegel der nicht-EZV-expandierten, denervierten Hunde stiegen während der PEEP-Beatmung an und könnten mit zu dem PRA-Anstieg dieser Hunde während PEEP-Beatmung beigetragen haben (Johnson et al. 1979). Zusätzlich stieg bei den nicht EZV-expandierten Hunden während der PEEP-Beatmung das ADH an. Das ANP zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Protokollen.

7.3 Diskussion

Als Ergebnis dieser Studie ergab sich also, dass bei bilateral denervierten, wachen Hunden, deren Natriumzufuhr normal ist, den Nierennerven keine wesentliche Rolle für die zu beobachtende Wasser- und Natriumretention während maschineller Beatmung zukommt.

Die Natrium- und Wasserausscheidung war sowohl unter Spontanatmung als auch unter PEEP-Beatmung unabhängig davon, ob die Hunde bilateral denerviert waren oder nicht.

Dieser Befund steht im Widerspruch zur einzigen anderen Studie, die die hämodynamischen und renalen Effekte positiver Druckbeatmung nach renaler Denervierung untersuchte. In dieser von Fewell & Bond (1979) durchgeführten Studie wurden Pentobarbital-anästhesierte Hunde verwendet. Diese Hunde waren chirurgisch gestresst (Herzfrequenz 140/min, MAP 130 mmHg), weil ihnen direkt vor Beginn der Studie ein Aortenokkluder implantiert wurde, mit dem der renale Perfusionsdruck auf 100 mmHg reduziert wurde. Außerdem wurde das Osmodiuretikum Mannitol infundiert. Unter diesen experimentellen Bedingungen wurde gefunden, dass die renale Denervation die Abnahme des Harnvolumens, der Natriumausscheidung und der GFR verhinderte (Fewell & Bond 1979). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu Beobachtungen, die an wachen, nicht beatmeten Hunden gemacht wurden (Bencsáth et al. 1982; Berne 1952; Lifschitz 1978). Die Unterschiede zwischen wachen und anästhesierten Hunden sind höchstwahrscheinlich auf die Anästhesie und deren Begleiteffekte sowie auf den chirurgischen Stress zurückzuführen (Berne 1952; Kirchner 1974; Sadowski et al. 1979).

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Effekte eine Beatmung mit 15 cm H₂O PEEP während einer Isofluran-Lachgasnarkose (1,1 MAC; minimale alveoläre „Konzentration“) auf die Hämodynamik und das RAAS unserer Hunde hat, untersuchten wir drei EZV-expandierte Hunde vor und nach renaler Denervation. Es kam zu einem starken Abfall der Wasser- und Natriumausscheidung (10-20 % der Werte der wachen Hunde), einem leichten Abfall des MAP (ca. 115 mmHg wach gegen ca. 100 mmHg narkotisiert) und einem deutlichen Abfall der GFR (4,5 wach gegen 2,6 ml·kg KG⁻¹·min⁻¹ narkotisiert) sowie einer starken Stimulation des RAAS besonders in den renal innervierten Hunden (PRA 5 denerviert gegen 11 ng AI·ml⁻¹·h⁻¹ innerviert). Wie oben besprochen, kann eine Sympathikusstimulation durch indirekte und direkte Auswirkungen der Narkose zur verstärkten Natrium- und Wasserretention unter Narkosebedingungen beitragen. Eine Denervationsdiurese oder -natriurese konnten wir bei den drei von uns untersuchten Hunden nicht finden. Es ist vorstellbar, dass der Organismus eine chronische Denervation der Nieren durch andere, z. B. hormonelle und hämodynamische, extra- und intrarenale Mechanismen kompensieren kann. Unsere Beobachtungen an narkotisierten Hunden können und sollten jedoch nur einen ersten Eindruck vermitteln.

Da das RAAS unter PEEP-Beatmung besonders in den *nicht-EZV-expandierten* Hunden aktiviert ist (Abb. 13), könnte man spekulieren, dass die Gabe von Angiotensin II-AT₁-Rezeptorblockern oder ACE-Hemmern die Wasser- und Natriumausscheidung während PEEP-Beatmung verbessern könnte. Dies muss aber nicht notwendigerweise der Fall sein, da diese Medikamente häufig den arteriellen Blutdruck und damit den renalen Perfusionsdruck vermindern. Dadurch kann trotz der Blockade eines potentiell Natrium-retinierenden Hormons wie des Angiotensin II das Ausmaß der Natriumretention letztlich unverändert bleiben. So konnten wir unter Angiotensin II-AT₁-Rezeptorblockade mit Losartan bei *nicht-EZV-expandierten* Hunden unter PEEP-Beatmung keine gesteigerte Wasser- und Natriumausscheidung beobachten [Krebs et al. 1999b (P17)]. Der MAP fiel um ca. 10 mmHg, während der Anstieg des ADH und Aldosterons nahezu gleichstark war wie bei den unbehandelten *nicht-EZV-expandierten* Hunden.

Bei *EZV-expandierten* Hunden hingegen kam es sowohl unter ACE-Hemmer Behandlung als auch unter AT₁-Blockade zu keinem Abfall des arteriellen Mitteldrucks unter PEEP-Beatmung. Gleichzeitig war bei den EZV-expandierten Hunden die Wasser- und Natriumretention während der zweistündigen PEEP-Beatmungsperiode - im Vergleich

zur unbehandelten Gruppe - deutlich geringer (Krebs et al. 1999b, Kaczmarczyk et al. 1992).

Fasst man die aus all unseren Versuchen an wachen Hunden unter PEEP-Beatmung erzielten Ergebnisse zusammen, dann scheint bei *EZV-expandierten wachen* Hunden der Anstieg des Nierenvenen-Drucks der wichtigste Grund für die Natrium- und Wasserretention unter PEEP-Beatmung zu sein (Rossaint et al. 1993). Während bei *nicht-EZV-expandierten* Hunden, der Anstieg des ADH, sowie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems die für die Retention wesentliche Faktoren zu sein scheinen (Boemke et al. 1998 (P16), Kaczmarczyk et al. 1993; Kaczmarczyk et al. 1992; Krebs et al. 1999b (P17); Rossaint et al. 1992).

8 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde insbesondere die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bei chronischen und akuten Regelvorgängen im Salz-Wasser-Haushalt an wachen Hunden untersucht.

Nach einer Einführung in die Methodik der **Langzeitstudien** (P1, P3, P4, P9) wurden zunächst die *zirkadianen und ultradianen Veränderungen der Natriumausscheidung* beschrieben, wie wir sie bei den Hunden beobachten konnten (P5, P6). Wir konnten zeigen, dass das Natriumausscheidungsmuster bei Hunden das Resultat endogener Rhythmizität und exogen, reaktiver Prozesse zu sein scheint. Beide Komponenten scheinen zur Aufrechterhaltung der Natriumhomöostase beizutragen. Der Anteil, der jeder der beiden Komponenten dabei zukommt, ist u.a. abhängig von der Höhe der Natriumzufuhr. Die konstante Infusion einer bestimmten Natriummenge führt auch über Tage betrachtet nicht zu einer konstanten Ausscheidung. Theoretisch sollte es nach unseren Berechnungen möglich sein, pro Tag eine Natriummenge von ca. 5 mmol pro Kilogramm Körpergewicht durch die Aktivität endogener Mechanismen auszuscheiden – d.h. ohne dass hierfür eine konstante, obligate basale Natriumausscheidung nötig wäre.

Bei der Infusion natriumretinierender Hormone wie Aldosteron und Angiotensin II stellten wir fest, dass sich das Ausscheidungsmuster von Natrium und Wasser bei unseren Versuchshunden dadurch in charakteristischer Weise veränderte: ein größerer Anteil der täglichen Natrium- und Wasserausscheidung verschob sich unter diesen Bedingungen in die Abend- und Nachtstunden. Wir haben dieses Phänomen als „*Nachtverschiebung*“ bezeichnet (P8, P10, P11). Die Nachtverschiebung blieb auch dann noch bestehen, als die 24-Stunden-Tagesbilanzen von Natrium und Wasser bereits wieder ausgeglichen waren, d.h. nachdem es zum „Escape“ gekommen war. Aber auch bei negativer Natriumbilanz, in unserem Fall hervorgerufen durch kontinuierliche Captoprilinfusion, konnte eine Nachtverschiebung beobachtet werden. Es deutet deshalb einiges darauf hin, dass bei Hunden – und ähnliche Befunde gibt es auch für den Menschen - die „Nachtverschiebung“ ein Hinweis für die Anwesenheit von Störfaktoren ist, die in die „normale“ (ungestörte) Regulation des Salzwasserhaushalts und/oder der Nierenfunktion eingreifen. Die „Nachtverschiebung“ scheint dabei letztlich dem Einstellen einer ausgeglichenen 24-h-Natrium- und Wasserbilanz zu dienen.

In Bilanzstudien über vier Tage wurde dann der Frage nachgegangen, ob das *GK-Natrium eine kontrollierte Variable* ist (P2, P7, P9, P12). Wir konnten zeigen, dass zwei Faktoren bei der Kontrolle des GK-Natriums eine wesentliche Rolle spielen, die Aktivität des RAAS und der renale Perfusionsdruck. Ist nur eine dieser Komponenten gestört, kann sie durch die andere - was das Einstellen eines 24-Stunden Bilanzgleichgewichtes angeht - ausgeglichen werden, allerdings nur unter Inkaufnahme eines veränderten GK-Natriumbestands: Beim Mineralokortikoid-Escape scheint es vornehmlich die Drucknatriurese, beim Druck-Escape (Einstellen einer ausgeglichenen Natrium- und Wasserbilanz bei kontinuierlich vermindertem renalen Perfusionsdruck) vornehmlich die endogene Unterdrückung des Angiotensin-Aldosteron-Systems zu sein, die zum Ausgleich der Natrium-Tagesbilanzen führt. Beide Komponenten, der renale Perfusionsdruck und das RAAS, scheinen als Kompensationsmechanismen – wenn es darum geht eine Zunahme des GK-Natriums und GK-Wassers zu verhindern - annähernd gleiche Potenz zu haben. Der GK-Natrium-Bestand scheint langfristig weder durch den renalen Perfusionsdruck, noch durch das RAAS allein kontrolliert werden zu können.

Am gleichen Hundemodell untersuchten wir ebenfalls über vier Tage die *Bedeutung des NO für die langfristige Regelung des Natriumbestandes* (P13). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der NO-Synthase (NOS) - bei unverändertem renalen Perfusionsdruck - zu einer transient negativen Natriumbilanz führt. Wird der renale Perfusionsdruck langfristig um ca. 20 % vermindert, kommt es zum Druck-Escape (s.o.), das durch die NOS-Inhibition weder in seinem zeitlichen Verlauf noch in der Menge des am ersten Tages retinierten Natriums und Wassers verändert wird. Mit und ohne NOS-Inhibition ist das Druck-Escape von einer Verminderung des Plasma-Aldosterons begleitet. Auffallend war, dass die PRA-Werte bei den Hunden während NOS-Inhibition durchweg niedriger waren als bei solchen mit intaktem NO-System. Der Aldosteron / PRA Quotient war unter NOS-Inhibition deutlich größer als in den jeweiligen Protokollen ohne NOS-Inhibition.

Dies ist ein eindrucksvolles Beispiel für die Tatsache, dass gravierende Veränderungen hormonaler Verhältnisse - wie z.B. der Anstieg des Aldosterone / PRA Quotienten unter NOS-Inhibition - auftreten können, ohne dass es zu Veränderungen einer anderen beobachteten Variable kommt - wie z.B. der Natriumausscheidung unter rRPP – die üblicherweise in enger Beziehung zu eben diesen Hormonen steht.

In **Kurzzeitstudien** (3-4 Stunden) wurden wache Hunde unter zwei Bedingungen untersucht, die ebenfalls mit Störungen im Salz-Wasserhaushalt und Bestandsveränderungen einhergehen können und dem Anästhesisten und Intensivmediziner häufiger begegnen: Die akute *Hypoxie*, die akut mit einer Verminderung des Natrium- und Wasserbestandes einhergehen kann („Höhendiurese“) (P14, P15), sowie die *kontrollierte maschinelle Beatmung mit hohen positiv-end-expiratorischen (PEEP) Drucken*, die zur Natrium- und Wasserretention führen kann (P16, P17).

Hypoxieversuche: Bei wachen Hunden fanden wir regelhaft einen Abfall der PRA-, Angiotensin II- und Aldosteronwerte unter Hypoxie (P14, P15). Es zeigte sich, dass das in niedrigen Plasma-Konzentrationen als Adenosin-1-Rezeptorantagonist wirkende Theophyllin den Abfall der PRA und des Angiotensin II unter Hypoxie verhindern kann. Auf der anderen Seite fiel die Plasma-Aldosteron-Konzentration während Hypoxie unabhängig davon, ob Theophyllin infundiert wurde oder nicht (P15).

Wahrscheinlich sind die in beiden Protokollen – mit und ohne Theophyllin - erniedrigten Plasma-Aldosteronkonzentrationen direkt durch die von Brickner et al. (1992) beschriebene verminderte Aktivität der 18-Hydroxylase während Hypoxie bedingt, die die Konversion von Kortisol in Aldosteron in den Zona-Glomerulosa-Zellen der Nebennierenrinde beschleunigt. So wäre zu erklären, dass die Aldosteronkonzentration unter Theophyllininfusion fällt, obwohl das PRA und die Angiotensinkonzentrationen konstant bleiben. Die erniedrigten PRA and Angiotensin II Spiegel scheinen hingegen - in noch nicht geklärter Weise - mit dem A₁-Rezeptor und dem Adenosin in Verbindung zu stehen.

PEEP-Beatmung: Eine Natrium- und Wasserretention, d.h. eine Erhöhung des GK-Natrium- und Wasserbestandes, wird häufig unter kontrollierter maschineller Beatmung beobachtet, besonders wenn diese mit PEEP durchgeführt wird. Wir untersuchten, ob und in welchem Ausmaß das sympathische Nervensystem der Niere und das RAAS an dieser Natrium- und Wasserretention beteiligt ist.

Es zeigte sich, dass bei bilateral denervierten, wachen Hunden, deren Natriumzufuhr normal ist, den Nierenerven keine wesentliche Rolle für die zu beobachtende Wasser- und Natriumretention während maschineller Beatmung zukommt. Faßt man die Vielzahl der zu diesem Thema in der AG Experimentelle Anästhesie durchgeführten Versuche zusammen, dann ergibt sich folgendes Bild:

Bei *Extrazellulärvolumen (EZV)-expandierten wachen* Hunden scheint der Anstieg des Nierenvenen-Drucks der wichtigste Grund für die Natrium- und Wasserretention unter

PEEP-Beatmung zu sein, während bei *nicht-EZV-expandierten* Hunden der Anstieg des ADH sowie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems die für die Retention wesentlichen Faktoren zu sein scheinen (P16, P17).

Aus den oben beschriebenen Untersuchungen ergeben sich eine Vielzahl interessanter Fragen für zukünftige Studien. In den *Langzeitversuchen* könnte beispielweise die Frage geklärt werden, wie sich das Druck-Escape entwickelt und welche Regelmechanismen bei Hunden aktiviert werden, die mit einer niedrigen Natriumzufuhr vorernährt wurden und deren GK-Natriumbestand sich somit am Minimum der Norm befindet. Was passiert, wenn der GK-Natriumbestand mit Diuretika und/oder Peritonealdialyse effektiv vermindert wird? Finden die Hunde dann unter rRPP-Bedingungen zum „Set-point“ zurück oder führt die Reduktion des renalen Perfusionsdrucks auch bei ihnen zu einem Bilanzausgleich auf einem Niveau des GK-Natriumbestandes, das oberhalb des „Set-points“ liegt?

In weiteren *Hypoxie-Versuchen* könnte die Interaktion zwischen NO, RAAS und Endothelinsystem näher untersucht werden. Endotheline (ET) sollen das Renin während Hypoxie möglicherweise über einen ET_A -Rezeptor-abhängigen Weg unterdrücken können. Andererseits ist auch bekannt, dass es eine Beziehung zwischen dem Endothelin-System und NO gibt. Unsere Ergebnisse bei NOS inhibierten Hunden wiederum deuten auf eine Beziehung zwischen dem RAAS und NO hin (deutlich reduzierte PRA-Werte und eine auffällige Erhöhung des Aldosteron/PRA-Verhältnisses nach NOS-Inhibition). Durch die Applikation verschiedener Blockersubstanzen (AT_1 -, A_1 -, ET_A -, ET_B -Blocker, NOS-Inhibitor) könnte versucht werden, Licht in diese Interaktionen zu bringen.

Bezüglich der Mechanismen für die Natrium- und Wasserretention unter PEEP-Beatmung wären Versuche in genau definierten Narkosetiefen mit verschiedenen Anästhesieformen interessant, z.B. total intravenöse Anästhesie mit Propofol-Remifentanyl im Vergleich zur Inhalationsanästhesie mit Isofluran/Lachgas. Vor allem, wenn die Untersuchungen an Tieren unter standardisierten Haltungs- und Ernährungsbedingungen und genau kontrolliertem Volumenstatus durchgeführt werden.

Letztlich wird eine Erkenntnis wahrscheinlich immer wiederkehren: Das Endresultat eines Regelvorganges mag das gleiche sein, das Zusammenspiel der Rückkopplungs- und Regelsysteme, die dieses Resultat zustande bringen, jedoch ein völlig anderes. Diese

Regelsysteme zu untersuchen, ist Aufgabe der integrativen Physiologie. Einige der zur Zeit meines Erachtens überzeugendsten Untersuchungstechniken am wachen Hund wurden in dieser Arbeit vorgestellt. Trotz aller Fortschritte und wichtiger Erkenntnisse aus den Laboratorien der Zell- und Molekularbiologen sollte nicht vergessen werden, dass die Bedeutung eines Bausteins für das Ganze letztlich nur am Ganzen zu erkennen ist. Dies ist es, was die integrative Physiologie auch heute noch unverzichtbar macht.

9 Literaturverzeichnis

Ackermann A, Fernandez-Alfonso MS, Sanchez dR, Ortega T, Paul M, Gonzalez C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 124: 291-298, 1998.

Affeld K, Echt M, Mohnhaupt A, Baer P, Henning E, Bücherl ES. A new method for driftfree measurement of venous pressures. *Proc. ESAO 2*: 142-147, 1975.

Alvarez G, Osuna A, Wangensteen R, Vargas F. Interaction between nitric oxide and mineralocorticoids in the long-term control of blood pressure. *Hypertension* 35: 752-757, 2000.

August JT, Nelson DH, Thorn GW. Response of normal Subjects to large amounts of aldosterone. *J. Clin. Invest.* 37:1549-1555, 1958.

Bärtsch P, Pfluger N, Audetat M, Shaw S, Weidmann P, Vock P, Vetter W, Rennie D, Oelz O. Effects of slow ascent to 4559 m on fluid homeostasis. *Aviat. Space Environ. Med.* 62:105-110, 1991.

Baldwin DS, Sirota JH, Villareal H. Diurnal variations of renal function in congestive heart failure. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 74:578-581, 1950.

Baumann JE, Persson PB, Ehmke H, Nafz B, Kirchheim HR. Role of endothelium-derived relaxing factor in renal autoregulation in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 263: F208-F213, 1992.

Baylis C, Harvey J, Santmyre BR, Engels K. Pressor and renal vasoconstrictor responses to acute systemic nitric oxide synthesis inhibition are independent of the sympathetic nervous system and angiotensin II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 693-698, 1999.

Beierwaltes WH. Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.* 272: R1359-R1364, 1997.

- Bencsáth P, Fekete MI, Kanyicska B, Szénási G, Takács L. Renal excretion of sodium after bilateral renal sympathectomy in the anaesthetized and conscious rat. *J. Physiol.* 331: 443-50, 1982.
- Berne RM. Hemodynamics and sodium excretion of denervated kidney in anesthetized and unanesthetized dog. *Am. J. Physiol.* 171: 148-58, 1952.
- Boemke W, Palm Ü, Kaczmarczyk G, Reinhardt HW. Effect of high sodium and high water intake on 24-h-potassium balance in dogs. *Z. Versuchstierkunde* 33: 179-185, 1990 **(P1)**.
- Boemke W, Palm Ü, Corea M, Seeliger E, Reinhardt HW. Endogenous variations and sodium intake-dependent components of diurnal sodium excretion patterns in dogs. *J. Physiology (London)* 476: 547-552, 1994 **(P6)**.
- Boemke W, Palm Ü, Mohnhaupt R, Corea M, Seeliger E, Reinhardt, HW. Influence of Captopril on 24-hour balances and the diurnal patterns of urinary output, blood pressure, aldosterone and atrial natriuretic peptide in conscious dogs. *Renal Physiology and Biochemistry* 18: 35-48, 1995 **(P8)**.
- Boemke W, Seeliger E, Rothermund L, Corea M, Pettker R, Mollenhauer G, Reinhardt HW. ACE inhibition prevents Na and water retention and MABP increase during reduction of renal perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 269: R481-R489, 1995 **(P9)**.
- Boemke W, Krebs MO, Djalali K, Bünger H, Kaczmarczyk G. Renal nerves are not involved in sodium and water retention during mechanical ventilation in awake dogs. *Anesthesiology* 89: 942-53, 1998 **(P16)**.
- Broere A, Van Den Meiracker AH, Boomsma F, Derkx FH, Veld AJ, Schalekamp MA. Human renal and systemic hemodynamic, natriuretic, and neurohumoral responses to different doses of L-NAME. *Am. J. Physiol.* 275: F870-F877, 1998.
- Churchill PC, Churchill MC. A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 589-594, 1985.

Corea M, Seeliger E, Boemke W, Reinhardt HW. Diurnal pattern of sodium excretion in dogs with and without chronically reduced renal perfusion pressure. *Kidney & Blood Pressure Research* 19: 16-23, 1996 (P11).

Cowley AW. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol. Rev.* 72: 231-300, 1992.

Dalgard DW, Marshall PM, Fitzgerald GH, Rendon F. Surgical technique for a permanent tracheostomy in Beagle dogs. *Lab. Anim. Sci.* 29: 367-370, 1979.

Doe RP, Vennes JA, Flink EBG. Diurnal variation of 17-hydroxicorticoids, sodium, potassium, magnesium, and creatinin in normal subjects and in cases of treated adrenal insufficiency and Cushing's syndrom. *J. Clin. Endocrinol.* 20:253-265, 1960.

Dyer AR, Stamler R, Grimm R, Stamler J, Berman R, Gosch FC, Emidy LA, Elmer P, Fishman J, van Heel N, Civinelli G. Do hypertensive patients have a different diurnal pattern of electrolyte excretion? *Hypertension* 10:417-424, 1987.

Eitle E, Hiranyachattada S, Wang H, Harris PJ. Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274: C1075-C1080, 1998.

Fewell JE, Bond GC. Renal denervation eliminates the renal response to positive-pressure ventilation (40599). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 161: 574-8, 1979.

Fortepiani LA, Rodrigo E, Ortiz MC, Cachofeiro V, Atucha NM, Ruilope LM, Lahera V, Garcia-Estan J. Pressure natriuresis in nitric oxide-deficient hypertensive rats: effect of antihypertensive treatments. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 21-27, 1999.

Gonzalez JD, Llinas MT, Nava E, Ghiadoni L, Salazar FJ. Role of nitric oxide and prostaglandins in the long-term control of renal function. *Hypertension* 32: 33-38, 1998.

Granger JP, Kassab S, Novak J, Reckelhoff JF, Tucker B, Miller MT. Role of nitric oxide in modulating renal function and arterial pressure during chronic aldosterone excess. *Am. J. Physiol.* 276: R197-R202, 1999.

- Guyton AC. Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta Physiol Scand, Suppl.* 591, 139: 107-113, 1990.
- Guyton AC, Hall JE. Dominant role of the kidney in long-term regulation of arterial pressure and in hypertension: The integrated system for pressure control. In: *Textbook of Medical Physiology*, 10th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia (2000), pp. 195-209.
- Hall JE, Granger JP, Smith MJ, Jr., Premen AJ. Role of renal hemodynamics and arterial pressure in aldosterone "escape". *Hypertension* 6: I183-I192, 1984.
- Hanke CJ, Drewett JG, Myers CR, Campbell WB. Nitric oxide inhibits aldosterone synthesis by a guanylyl cyclase-independent effect. *Endocrinology* 139: 4053-4060, 1998.
- Hanke CJ, Campbell WB. Endothelial cell nitric oxide inhibits aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells: modulation by oxygen. *Am. J. Physiol.* 279: E846-E854, 2000.
- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, and Goodman Gilman A (Editors). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9th ed.). New York: McGraw-Hill. 1996. p 673.
- Hickey DS, Kirkland JL, Lucas SB, Lye M. Analysis of circadian rhythms by fitting a least squares sine curve. *Comput. Biol. Med.* 14:217-223, 1984.
- Höhne C, Krebs MO, Boemke W, Arntz E, Kaczmarczyk G. Evidence that the renin decrease during hypoxia is adenosine-mediated in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 90: 1842-1848, 2001 (P15).
- Hu L, Manning RD, Jr., Brands MW. Long-term cardiovascular role of nitric oxide in conscious rats. *Hypertension* 23:185-194, 1994.
- Jackson EK. Adenosine - A physiological brake on renin release. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31: 1-35, 1991.

Johnson MD, Fahri ER, Troen BR, Barger AC. Plasma epinephrine and control of plasma renin activity: Possible extrarenal mechanisms. *Am. J. Physiol.* 236: H854-H859, 1979.

Kaczmarczyk G, Jörres D, Rossaint R, Krebs M, Unger V, Falke K. Extracellular volume expansion inhibits antidiuretic hormone increase during positive end-expiratory pressure in conscious dogs. *Clin. Sci.* 85: 643-9, 1993.

Kaczmarczyk G, Rossaint R, Altmann C, Falke K, Mohnhaupt R, Reinhardt HW. ACE inhibition facilitates sodium and water excretion during PEEP in conscious volume-hypervolemic dogs. *J. Appl. Physiol.* 73: 962-7, 1992.

Keynes RJ, Smith GW, Slater JD, Brown MM, Brown SE, Payne NN, Jowett TP, Monge CC. Renin and aldosterone at high altitude in man. *J. Endocr.* 92: 131-140, 1982.

Khraibi AA. Inhibition of nitric oxide causes exaggerated natriuresis in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 266: F762-F766, 1994.

Kirchner F. Correlations between changes of activity of the renal sympathetic nerve and behavioural events in unrestrained cats. *Basic Res. Cardiol.* 69: 243-56, 1974.

Krebs MO, Boemke W, Simon S, Wenz M, Kaczmarczyk G. Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in conscious dogs decrease renin and is unaffected by losartan. *J. Appl. Physiol.* 86: 1914-1919, 1999a (P14).

Krebs MO, Kröhn T, Boemke W, Mohnhaupt R, Kaczmarczyk G. Renal and hemodynamic effects of losartan in conscious dogs during controlled mechanical ventilation. *Am. J. Physiol.* 276: F425-F432, 1999b (P17).

Lennon EJ, Ruetz PP, Engstrom WW. Reversal of diurnal rhythm in excretion of water and salt in primary hyperaldosteronism. *Am. J. Med.* 30: 475-485, 1961.

Lifschitz MD. Lack of a role for the renal nerves in renal sodium reabsorption in conscious dogs. *Clin. Sci. Mol. Med.* 54: 567-72, 1978.

Majid DS, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* 264: F79-F87, 1993.

Manning RD, Jr., Hu L, Reckelhoff JF. Role of nitric oxide in the arterial pressure and renal adaptations to long-term changes in sodium intake. *Am. J. Physiol.* 272: R1162-R1169, 1997.

Manning RD, Jr., Hu L, Williamson TD. Mechanisms involved in the cardiovascular-renal actions of nitric oxide inhibition. *Hypertension* 23: 951-956, 1994.

Messing B, Peitra C, Debure A, Beliah M, Bernier J. Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *J. Enteral. Parenteral Nutrition* 12: 185-189, 1988.

Moe O, Tejedor A, Campbell WB, Alpern RJ, Henrich WL. Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *Am. J. Physiol.* 260: E521-E525, 1991.

Nafz B, Persson PB, Ehmke H, Kirchheim HR. A servo-control system for open- and closed-loop blood pressure regulation. *Am. J. Physiol.* 262: F320-F325, 1992.

Navarro J, Sanchez A, Saiz J, Ruilope LM, Garcia-Estan J, Romero JC, Moncada S, Lahera V. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am. J. Physiol.* 267: R1516-R1521, 1994

Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. Methods for Cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6: 305-323, 1979.

Neylon M, Marshall J, Johns EJ. The role of the renin-angiotensin system in the renal response to moderate hypoxia in the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 491: 479-488, 1996.

Nienhaus M. Methoden zur computerunterstützten Langzeitmessung des renalen Blutflusses mittels 20-Mhz-Doppler-Ultraschall an wachen, chronisch instrumentierten Hunden. *Inaugural Dissertation*, Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin, 1993.

Palm Ü. Rhythmische und nichtrhythmische Komponenten bei der Aufrechterhaltung der Natrium- und Wasserhomöostase: Langzeituntersuchungen an wachen Hunden. *Inaugural Dissertation*, Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin, 1990.

Palm Ü, Boemke W, Bayerl D, Schnoy N, Juhr N-C, Reinhardt HW. Prevention of catheter-related infections by a new, catheter-restricted antibiotic filling technique. *Laboratory Animals* 25: 142-152, 1991 (P4).

Palm Ü, Boemke W, Reinhardt HW. Rhythmicity of urinary sodium excretion, mean arterial blood pressure, and heart rate in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 262: H149-H156, 1992 (P5).

Pathak JD, Joshi SV. Early indicators of deteriorating renal efficiency in elderly subjects. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 35: 199-202, 1991.

Payne RW, de Wardener HE. Reversal of urinary diurnal rhythm following head injury. *Lancet* 1: 1098-1101, 1958.

Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR, Nafz B. Endothelium-derived NO stimulates pressure-dependent renin release in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 264: F943-F947, 1993.

Priebe HJ, Heimann JC, Hedley-Whyte J. Mechanisms of renal dysfunction during positive end-expiratory pressure ventilation. *J. Appl. Physiol.* 50: 643-649, 1981.

Qiu C, Muchant D, Beierwaltes WH, Racusen L, Baylis C. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension* 31: 21-26, 1998.

Rakugi H, Nakamura M, Saito H, Higaki J, Ogihara T. Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 1244-1247, 1988.

Reinhardt HW, Hey A, Mohnhaupt R, Palm Ü. Control of sodium excretion: atrial natriuresis and mineralocorticoid escape: some new aspects. *Biomed. Biochim. Acta* 46: 965-971, 1987.

Reinhardt HW, Boemke W, Jöckel A, Palm Ü, Hey A. Day-night variation in 24-h-urinary excretion pattern after opening of “feedback loops” involved in Na-homeostasis.

Physiologist 33: 96.9, Abstract, 1990.

Reinhardt HW, Boemke W, Palm Ü, Kaczmarczyk G. What causes escape from sodium retaining hormones? *Acta Physiol. Scand.* 139, *Suppl.* 591:12-17, 1990a (**P2**).

Reinhardt HW, Palm Ü, Mohnhaupt R, Dannenberg K, Boemke W. Computer assisted long term measurements of urinary output and other biological data. *Am. J. Physiol.* 258: R274-R280, 1990b (**P3**).

Reinhardt HW, Leyssac PP, Bie P (ed.). Mechanisms of sodium homeostasis, sodium and water excretion in mammals - haemodynamic, endocrine, and neural mechanisms. *Acta Physiol. Scand.* 139, *Suppl.* 591:1-139, 1990c.

Reinhardt HW, Boemke W, Corea M, Hellwig-Träger R, Bayerl D, Molling S. Methode zur schonenden Durchführung von Langzeitversuchen mit chronisch instrumentierten Beagle Hunden. *Tierlaboratorium* 15: 99-112, 1992.

Reinhardt HW, Corea M, Boemke W, Pettker R, Rothermund L, Scholz A, Schwietzer G, Persson PB. Resetting of 24-h sodium and water balance during 4 days of servo-controlled reduction of renal perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 266: H650-H657, 1994 (**P7**).

Reinhardt HW, Seeliger E, Boemke W, Corea M, Rothermund L. Salz- und Wasserhaushalt: Muß man davon in der Praxis etwas wissen? *Therapiewoche* 44: 744-747, 1994.

Reinhardt HW, Seeliger E, Lohmann K, Corea M, Boemke W. Changes of blood pressure, sodium excretion and sodium balance due to variations of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J. Auton. Nervous System* 57: 184-187, 1996 (**P10**).

Reinhardt HW, Seeliger E. Toward an integrative concept of control of total body sodium. *News in Physiol. Sci.* 15: 319-325, 2000.

- Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2: 1371-1387, 1992.
- Rossaint R, Jörres D, Nienhaus M, Oduah K, Falke K, Kaczmarczyk G. Positive end-expiratory pressure reduces renal excretion without hormonal activation after volume expansion in dogs. *Anesthesiology* 77: 700-8, 1992.
- Rossaint R, Krebs M, Förther J, Unger V, Falke K, Kaczmarczyk G, Falke K. Inferior vena caval pressure increase contributes to sodium and water retention during PEEP in awake dogs. *J. Appl. Physiol.* 75: 2484-92, 1993.
- Sadowski J, Kurkus J, Gellert R. Denervated and intact kidney response to saline load in awake and anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* 237: F262-7, 1979.
- Salazar FJ, Pinilla JM, Lopez F, Romero JC, Quesada T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 20:113-117, 1992.
- Scholz H, Krämer BK, Hamann M, Götz KH, Kurtz A. Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiolo. Scand.* 155: 173-182, 1995.
- Schweda F, Schweda A, Pfeifer M, Blumberg FC, Kammerl MC, Holmer SR, Riegger GA, Kramer BK. Role of endothelins for the regulation of renin gene expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36: S187-90, 2000.
- Seeliger E, Boemke W, Corea M, Encke E, Reinhardt HW. Mechanisms compensating Na and water retention induced by long-term reduction of renal perfusion pressure. *Am. J. Physiol.* 273: R646-R654, 1997 **(P12)**.
- Seeliger E, Persson PB, Boemke W, Mollenhauer G, Nafz B, Reinhardt HW. Low dose nitric oxide inhibition causes negative sodium balance in conscious dogs. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001 **(P13)**.
- Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13176-13181, 1996.

Shryock, JC., Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 79: 2-10, 1997.

Siragy HM, Johns RA, Peach MJ, Carey RM. Nitric oxide alters renal function and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Hypertension* 19: 775-779, 1992.

Skwarski KM, Morrison D, Barratt A, Lee M, MacNee W. Effects of hypoxia on renal hormonal balance in normal subjects and in patients with COPD. *Respir. Med.* 92: 1331-1336, 1998.

Sollberger A. Problems in the statistical analysis of short periodic time series. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 1: 49-88, 1970.

Sulzman FM, Fuller CA, Moore-Ede MC. Feeding time synchronizes primate circadian rhythms. *Physiol. & Behav.* 18: 775-779, 1977.

Usui M, Ichiki T, Katoh M, Egashira K, Takeshita A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. *Hypertension* 32: 527-533, 1998.

Van Cauter E, Huyberegts S. Problems in the statistical analysis of biological time series: the Cosinor test and the periodogram. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 4: 41-57, 1973.

Wang T. Nitric oxide regulates HCO₃⁻ and Na⁺ transport by a cGMP-mediated mechanism in the kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 272: F242-F248, 1997.

Weaver DR, Reppert SM. Adenosine receptor gene expression in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 263: F991-995, 1992.

Wells JN, Miller JR. Methylxanthine inhibitors of phosphodiesterase. *Methods Enzymol.* 159: 489-496, 1988.

Williams, M. Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27: 315-345, 1987.

Zaccaria M, Rocco S, Noventa D, Varnier M, Opocher G. Sodium regulating hormones at high altitude: basal and post-exercise levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 570-574, 1998.

10 Danksagung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Langzeitversuche an wachen Hunden wurden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Reinhardt in den Zentralen Tierlaboratorien der Freien Universität Berlin in Steglitz durchgeführt. Ohne ihn und sein engagiertes Team in der „AG Experimentelle Anästhesie“ wären diese äußerst aufwendigen Versuche nicht realisierbar gewesen. Nach der Pensionierung von Herrn Prof. Dr. H. W. Reinhardt im Jahr 1996 setzte ich unter Leitung von Frau Prof. G. Kaczmarczyk meine Arbeit in der „AG Experimentelle Anästhesie“ fort. Mit ihr und ihrem Team untersuchte ich u.a. die Auswirkungen von Hypoxie und Beatmung auf Regelvorgänge im Salz-Wasser-Haushalt.

Herrn Prof. Dr. H. Wolfgang Reinhardt danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und viele inspirierende Ideen. Besonders beeindruckend waren sein konsequentes, systematisches Aufarbeiten eines unbekanntes physiologischen Problems und das stets selbstkritische Beleuchten der erhobenen Daten. Die von ihm aufgebaute Methode zur Langzeituntersuchung von wachen Hunden dürfte weltweit ihresgleichen im Bereich der integrativen Physiologie suchen.

Meinem Freund Herrn Dr. Ülo Palm, mit dem ich über zwei Jahre in der AG Experimentelle Anästhesie zusammenarbeiten durfte, danke ich für die stets gute Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Diskussionen und nicht zuletzt für die Implementierung eines Verfahrens zur Zeitreihenanalyse, das eine qualitative Beschreibung unserer Kurvenverläufe ermöglichte.

Herr Dr. Marcel Corea hat meine Arbeit durch seinen großen Einsatz bei der Durchführung der Versuche sehr unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Erdmann Seeliger, der in den letzten Jahren die Langzeitversuche mit viel Elan sowohl praktisch als auch theoretisch vorangetrieben hat. Als „Vollblutphysiologe“ führt er heute erfolgreich und systematisch die von Prof. Dr. H. W. Reinhardt inaugurierten Langzeitversuche fort. Ich bin sicher, dass so noch viele interessante Ergebnisse über die Kontrollprozesse des Salz-Wasser-Haushaltes und der Blutdruckregulation erzielt werden.

Frau Prof. Dr. Gabriele Kaczmarczyk danke ich für die langjährige wohlwollende Unterstützung all meiner Projekte, die kollegiale Zusammenarbeit und viele kritische Diskussionen. Durch ihre „meinungsfreudige Persönlichkeit“ wurde es auf jeden Fall nie langweilig.

Meinem Freund Herrn Dr. Martin Otto Krebs danke ich für die praktische Einführung in die Kurzzeitversuche an wachen Hunden und seine Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Herr Dipl.-Ing. Rainer Mohnhaupt war mir bei allen Computerfragen ein kompetenter Berater, der sich immer vorbildlich um die technischen Versuchseinrichtungen kümmerte.

Ohne die Forschungs-MTAs Daniela Bayerl, Birgit Brandt und Sabine Molling wäre keines der Projekte durchführbar gewesen. Ich danke ihnen herzlich für ihre sorgfältige Laborarbeit und die liebevolle Betreuung der Hunde während der Versuche.

Der Feinmechanikermeister Herr Dannenberg war unentbehrlich für die Wartung und Herstellung der Drehkupplungs- und „Drossel“-Systeme. Seine vielen technisch-apparativen Hilfen machten uns und den Hunden die experimentelle Arbeit leichter.

Die Tierpfleger – besonders seien hier Hasan Salak, Reimunde Hellwig-Träger und Christina Kasprzak genannt - sorgten stets verantwortungsbewusst und einfühlsam für das Wohlergehen der Hunde.

Zahlreiche Doktoranden halfen mit großem Einsatz und viel Umsicht bei der Durchführung der Versuche und trugen so nicht unerheblich zum Gelingen der verschiedenen Projekte bei. Hier seien besonders erwähnt Dr. Lars Rothermund (ein Mann mit innovativen Ideen), Dr. Kathrin Lohmann, Dr. Reinhard Pettker, Götz Mollenhauer, Erdal Safak, Kourosch Djalali, Stefan Simon, Dr. Thorsten Kröhn, Nora Schleyer, Roland Francis und nicht zuletzt Dr. Claudia Höhne, die nach ihrer Dissertation als Forschungs-AIP ihre wissenschaftliche Tätigkeit in der AG Experimentelle Anästhesie fortsetzte: ihnen allen sei herzlich gedankt.

Herr Prof. Dr. K. J. Falke, der Leiter der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, unterstützte über alle Jahre meine wissenschaftliche Tätigkeit. Ohne seine „Rückendeckung“ und den Entfaltungsspielraum, den er mir, wenn immer möglich und mit der klinischen Tätigkeit vereinbar, gewährte, wäre eine wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen.

To April, Brendan, and Kyle for their support, their patience and understanding, and for their love.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....
Datum

.....
Unterschrift

Anhang

In dieser Arbeit verwendete eigene Publikationen, unterteilt in Langzeitversuche (P1 - P13) und Kurzzeitversuche (P14 - P17).

Die Titel dieser Veröffentlichungen wurden im Vorwort (S. 2 - 4) aufgelistet.