

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie
Abteilungsleiter: Professor Dr. H. Oßwald

Untersuchungen zur Regulation der
Kohlenmonoxid-bedingten Stimulation der
Erythropoetinsekretion bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Cathérine Simone Gebhard
aus
Rheinfelden (Baden)
2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

*Für meine Eltern
und
Caroline*

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	BISHERIGER KENNNTNISSTAND	1
1.1.1	ERYTHROPOETIN	1
1.1.2	HYPOXIE	4
1.1.3	KOHLLENMONOXID	7
1.1.4	TEIL I: EINFLUSS DES AUTONOMEN NERVENSYSTEMS AUF DIE EPO-SEKRETION	9
1.1.4.1	Innervation der Niere	9
1.1.4.2	Funktionelle Konsequenzen der renalen Denervierung	10
1.1.4.3	EPO-Sekretion nach renaler Denervierung und β -adrenerger Blockade oder Stimulation	10
1.1.4.4	Renale Wirkungen von Neuropeptid Y	12
1.1.5	TEIL II: EINFLUSS DER REDUKTION DES NIERENGEWEBES AUF DIE EPO-SEKRETION	14
1.1.5.1	Einseitige und subtotale (5/6) Nephrektomie und deren physiologische und morphologische Auswirkungen	14
1.1.5.2	Auswirkung von vermindertem Nierengewebe auf die EPO-Sekretion	15
1.1.6	TEIL III: EINFLUSS DER RENALEN DURCHBLUTUNG AUF DIE EPO-SEKRETION	15
1.1.6.1	Auswirkung der Ureterokklusion auf die Nierenfunktion	15
1.1.6.2	Stenosierung der Nierenarterie	16
1.1.6.3	EPO-Produktion nach Ureterokklusion und Nierenarterien-stenosierung	18
1.1.7	TEIL IV: EPO-PRODUKTION IN DER LEBER	19
1.1.7.1	EPO-Produktion in der fetalen und adulten Leber	19
1.1.7.2	Durchblutung der Leber im Fetalkreislauf	20
1.1.8	TEIL V: RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM (RAAS) UND EPO-SYNTHESE	23
1.1.8.1	Grundlagen	23
1.2	EIGENE FRAGESTELLUNG	25
2	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	27
2.1	VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	27
2.2	VERSUCHSGRUPPEN	27
2.3	VERSUCHSABLAUF	30
2.3.1	NARKOSEN	30
2.3.1.1	Ketamin/Rompun-Narkose	30
2.3.1.2	Diethylether-Narkose	30
2.3.2	TEIL I: PRÄPARATIONEN UND ZEITLICHER VERSUCHSABLAUF	30
2.3.2.1	Denervierung	30
2.3.2.2	Implantation von osmotischen Mikropumpen	31
2.3.3	TEIL II: PRÄPARATION UND ZEITLICHER VERSUCHSABLAUF	33
2.3.3.1	Einseitige Nephrektomie	33
2.3.3.2	Subtotale (5/6) Nephrektomie	33
2.3.4	TEIL III: PRÄPARATIONEN UND ZEITLICHER VERSUCHSABLAUF	34
2.3.4.1	Ureterligatur	34
2.3.4.2	Stenosierung und Flowmessung an der Nierenarterie	35
2.3.5	TEIL IV: PRÄPARATION UND ZEITLICHER VERSUCHSABLAUF	37
2.3.5.1	Arterialisierung der Leber	37

2.3.6	Probengewinnung	39
2.3.7	HYPOXIEKASTEN	40
2.4	MESSMETHODIK	43
2.4.1	ELEKTROMAGNETISCHE BLUTFLUSSMESSUNG	43
2.4.2	PLASMARENINBESTIMMUNG	44
2.4.3	REVERSED PHASE HPLC	44
2.4.4	BESTIMMUNG VON ERYTHROPOETIN IM ENZYMIMMUNOASSAY (ELISA)	45
2.4.5	BESTIMMUNG VON ERYTHROPOETIN-MRNA	46
2.5	VERWENDETE MATERIALIEN UND REAGENZIEN	49
2.5.1	TESTSUBSTANZEN	49
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	51

3 ERGEBNISSE **52**

3.1	TEIL I: EINFLUSS DES AUTONOMEN NERVENSYSTEMS AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	52
3.1.1	KONTROLLGRUPPEN	52
3.1.2	DOSISWIRKUNGSKURVE NACH BEIDSEITIGER DENERVIERUNG DER NIERENARTERIEN	55
3.1.3	EINFLUSS VON ISOPROTERENOL, NEUROPEPTID Y, PROPRANOLOL UND NEUROPEPTID Y-ANTAGONIST AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	58
3.2	TEIL II: EINFLUSS DER REDUKTION DES NIERENGEWEBES AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	62
3.2.1	EINSEITIGE UND SUBTOTALE NEPHREKTOMIE	62
3.3	TEIL III: EINFLUSS DER RENALEN DURCHBLUTUNG AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	65
3.3.1	VORVERSUCHE UND PRÜFUNG DES EXPERIMENTELLEN MODELLS	65
3.3.2	EINFLUSS DER AKUTEN UND CHRONISCHEN URETERLIGATUR AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	66
3.3.3	EINFLUSS DER NIERENARTERIENSTENOSIERUNG AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	69
3.4	TEIL IV: ROLLE DER LEBER BEI DER EPO-PRODUKTION	73
3.4.1	EPO-mRNA-EXPRESSION IN DER LEBER	73
3.4.2	EPO-mRNA-EXPRESSION IN DER LEBER NACH ARTERIALISIERUNG DER PFORTADER	75
3.5	TEIL V: RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM (RAAS) UND EPO-SYNTHESE	76

4 DISKUSSION **78**

4.1	DISKUSSION DER METHODE	78
4.1.1	TEIL I-V: KONTROLLGRUPPEN	78
4.1.2	TEIL I: NIERENDENERVIERUNG	78
4.1.3	TEIL III: URETERLIGATUR	79
4.1.4	TEIL III: STENOSIERUNG DER ARTERIA RENALIS	79
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	80
4.2.1	TEIL I: EINFLUSS DES AUTONOMEN NERVENSYSTEM AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	80

4.2.2	TEIL II: EINFLUSS DER REDUKTION DES NIERENGEWEBES AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	87
4.2.3	TEIL III: EINFLUSS DER RENALEN DURCHBLUTUNG AUF DIE CO-STIMULIERTE EPO-SEKRETION	90
4.2.4	TEIL IV: EINFLUSS DER LEBER-ARTERIALISIERUNG AUF DIE CO-STIMULIERTE HEPATISCHE EPO-SEKRETION	96
4.2.5	TEIL V: RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM (RAAS) UND EPO-SEKRETION	100
4.3	SCHLUSSFOLGERUNG	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	114
7	ANHANG	143
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	143

1 Einleitung

1.1 Bisheriger Kenntnisstand

1.1.1 Erythropoetin

Das Glykoproteidhormon Erythropoetin (EPO) besteht aus 165 Aminosäuren mit vier komplexen Kohlenhydratseitenketten, die ungefähr 40 % der Molekülmasse von EPO ausmachen (Abb. 1). Die Existenz von EPO ist seit etwa 100 Jahren bekannt [45]. Dennoch gelang es erst 1977, EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie zu isolieren [249]. 1985 entschlüsselten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die DNA-Sequenz des EPO-Gens und konnten das Gen erfolgreich in Säugetierzellen exprimieren [174;222]. EPO ist relativ temperatur- und pH- stabil und hat ein Molekulargewicht von 34-39 kD. Die Varianz des Molekulargewichts kommt durch die Heterogenität der Zuckerketten zustande, die endständig mit Neuraminsäurederivaten verknüpft sind (Abb. 1).

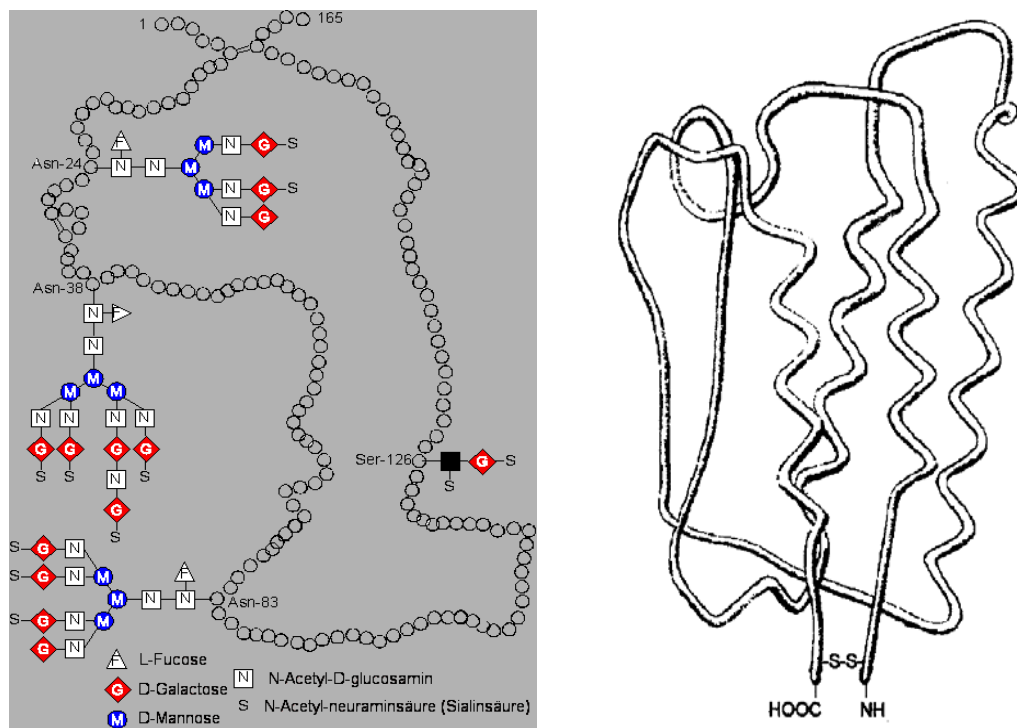


Abb. 1: Struktur des Erythropoetin-Moleküls [360]

Diese Neuraminsäurederivate schützen das Hormon vor einem raschen Abbau in der Leber [154]. Das EPO-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q21-q22) und besteht aus 5 Exons und 4 Introns [178].

Die EPO-Synthese findet in der Fetal- und Neonatalphase in den perisinusoidalen Itozellen und Hepatozyten der Leber statt [77;177], während später 80-90% in den peritubulären Fibroblasten der Niere gebildet werden [239]. Diese Zellen besitzen einen Sensor für den intrakapillären Sauerstoffgehalt. Differenzen zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf führen zu einer Steigerung der EPO-Synthese mit Anstieg des EPO-Plasmaspiegels, der normalerweise bei 6-25 U/l liegt (ELISA-Messung) [177]. Dieser kann unter Hypoxie und bei einigen Anämien bis zu tausendfach ansteigen [177]. Als Hauptstimulus für die EPO-Synthese gilt die Gewebehypoxie. Entscheidend ist dabei der Sauerstoffpartialdruck im Nierengewebe [104;183]. Vorstufen und Speicherformen des Hormons konnten bislang nicht nachgewiesen werden, so dass von einer de-novo-Synthese ausgegangen wird [151]. Es sind zirkadiane Schwankungen des EPO- Spiegels mit einem Maximum um Mitternacht und einem Tief in den Morgenstunden beschrieben worden [56;363]. Eine Alters- [56;245] oder Geschlechtsabhängigkeit [56;177;245] der EPO- Konzentration scheint nicht zu bestehen.

Die Wirkung des Hormons wird durch die Bindung an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen des BFU-E (erythroid blast forming units) und CFU-E (erythroid colony forming units) vermittelt. Die Bindung an den Rezeptor bewirkt eine Zunahme der RNA II-Polymerase-Aktivität, gefolgt von einer Steigerung der RNA-Synthese. EPO bewirkt im Knochenmark eine Proliferation und Differenzierung von unreifen BFU-E zu reifen BFU-E und weiter zu CFU-E, Erythroblasten und Retikulozyten [310;321] (Abb. 2). Das erste Hämoglobin kann bereits 5 Stunden nach der Bindung von EPO an seinen Rezeptor nachgewiesen werden. Jelkmann (1992) beschreibt einen Anstieg der Retikulozyten etwa 3-4 Tage nach einem Anstieg der EPO-Serum-Konzentration [177].

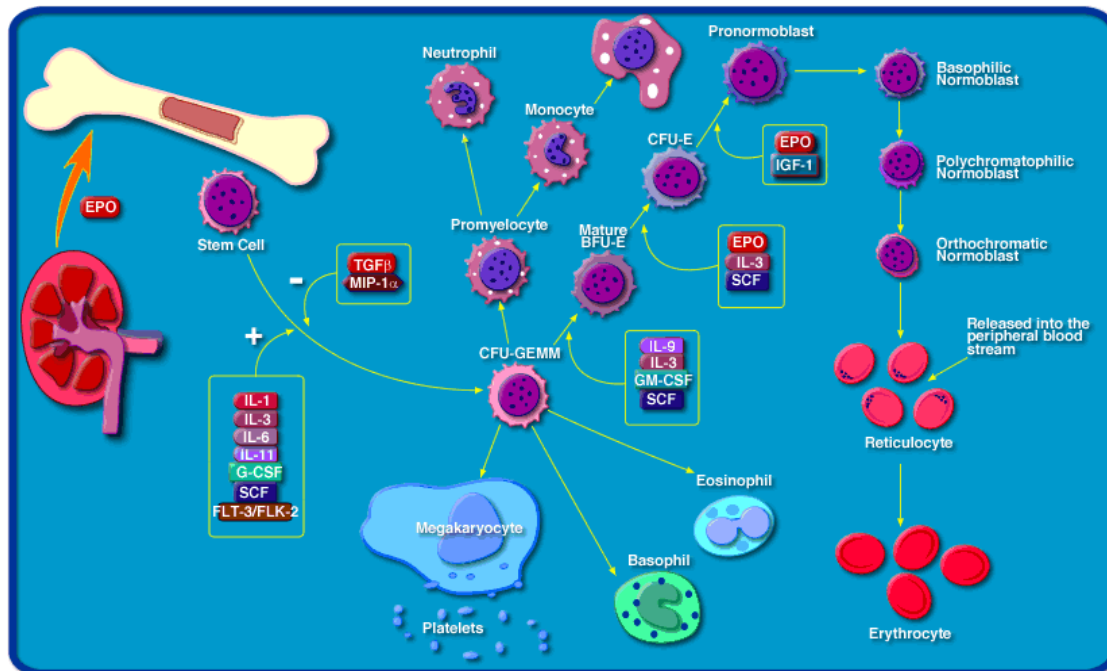


Abb. 2: Der erythropoetische Regelkreis, BFU-E (burst forming unit erythroid), CFU-GEMM (colony forming unit granulocyte erythrocyte macrophage), CFU-E (colony forming unit erythroid), EPO (Erythropoietin), FLK (fetal liver kinase), FLT (fms-like tyrosine kinase), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), IGF (insulin-like growth factor), IL (interleukin), MIP (macrophage inflammatory protein), SCF (stem cell factor), TGF (transforming growth factor)

Extrarenale Bildungsstätten sind beim Erwachsenen neben den Hepatozyten [77;177], die den Großteil der extrarenalen EPO-Produktion bereitstellen, die Kupfferschen Sternzellen der Leber [77], die Makrophagen des Knochenmarkes [177] und die Astrozyten des ZNS [238]. Geringe Mengen von EPO-mRNA wurden auch in Milz, Lunge, Hoden und Thymus nachgewiesen [86;236;339].

Eine unzureichende EPO-Produktion führt zu einer hyporegenerativen, normozytären, normochromen Anämie. Die häufigste Ursache des EPO-Mangels ist die chronische Niereninsuffizienz. Die Anämie wird meistens erst dann manifest, wenn die glomeruläre Filtrationsrate unter 30 ml/min abfällt.

EPO-Überproduktion führt zur Erythrozytose. Auslösender Faktor ist meist eine Gewebehypoxie (Beispiele: chronische Höhenkrankheit, Hämoglobinopathien mit erhöhter Sauerstoffaffinität des Blutes, gelegentlich respiratorische oder kardiale Insuffizienz). Erythrozytosen infolge paraneoplastischer EPO-

Produktion sowie die Posttransplantationserythrozytose nach Nierentransplantation wurden ebenfalls beschrieben [153].

Ebenso wie andere Glykoproteine wird EPO relativ langsam aus dem Blut entfernt. Der Abbau erfolgt überwiegend in der Leber [72]. Die Eliminationshalbwertszeit von intravenös verabreichtem homologen EPO beträgt bei Ratten etwa 1.5 bis 3.4 h [83;264;300;329]. Beim Menschen beträgt die α -Halbwertszeit von EPO 54 min, die β -Halbwertszeit 3.4 h [83]. Nach Hypoxie-Exposition wurde tierexperimentell eine durchschnittliche Halbwertszeit des endogenen Plasma-EPO von 5.2 h bestimmt [74].

1.1.2 Hypoxie

Zur oxidativen Phosphorylierung, der Hauptquelle der ATP-Erzeugung, aber auch für viele andere metabolische Prozesse benötigt die menschliche Zelle Sauerstoff. Der Säugetierorganismus hat deshalb eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um kurzfristig oder auch langfristig auf eine Sauerstoffunterversorgung zu reagieren. Hierzu zählen u.a. eine Erhöhung der Ventilationsrate, eine Senkung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) [270], Veränderungen der Nierenfunktion [113-115] sowie die Induktion mehrerer Gene:

- EPO [119]
- Transferrin [306]
- Endothelin-1 [43]
- VEGF (vascular endothelial growth factor) [90]
- Glukose-Transporter [245]
- Glykolyse-Enzyme [245]
- Zytokine (Interleukin 1, Interleukin 6, Interleukin 8) [148]
- Hämoxygenase 1 und extrazelluläre Matrix (Kollagen-5 α 1) [148]
- ADM (Adrenomedullin) [156]

Trotz zunehmender Erkenntnisse über die zellulären Reaktionen auf Hypoxie gibt es verschiedene Hypothesen über den genauen Mechanismus, wie Zellen die Änderungen in der Sauerstoffkonzentration detektieren und diese in eine

physiologische Antwort umwandeln. Eine Schlüsselrolle spielt dabei ein Proteinkomplex, der als HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer-Faktor) bezeichnet wird [327]. HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Struktur eine heterodimere Doppelhelix bildet und welcher durch eine reduzierte Sauerstoffspannung stabilisiert wird [361]. Der HIF-1 Komplex besteht aus zwei Untereinheiten: die HIF-1 β /ARNT-Untereinheit (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und eine Isoform der α -Untereinheiten (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α). Die HIF-1 α -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich synthetisiert und über das Ubiquitin-Proteasom-System wieder abgebaut. Unter Hypoxie reichert sich die HIF-1 α -Untereinheit vermehrt an [309;318]. Hypoxie induziert die Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit, was zu einer Aktivierung der Transkription oben genannter Zielgene führt [47] (Abb. 3).

Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche molekularen Mechanismen die Aktivität von HIF-1 beeinflussen. Unter Verwendung des Hep3B- und HepG2-Systems postulierten Goldberg et al. (1988), dass es sich bei dem Sauerstoffsensor um ein spezifisches Hämprotein handelt, das reversibel Sauerstoff bindet [119]. Versuche, ein Hämprotein mit den Eigenschaften eines Sauerstoffsensors zu isolieren, blieben jedoch bislang erfolglos. Die neben der Hämprotein-Hypothese derzeit diskutierten O₂-Sensormodelle werden im Folgenden aufgelistet:

Prolylhydroxylasen-Theorie: Die Arbeitsgruppen von Jaakola et al. (2001) und Ivan et al. (2001) konnten zeigen, dass bei Erreichen einer kritischen Sauerstoff- und Eisenkonzentration im Zytosol eine Interaktion zwischen einem Multiproteinkomplex, dem pVHL, und einer spezifischen Domäne der HIF-1 α -Untereinheit entsteht [170;172]. Als VHL (von Hippel-Lindau)-Syndrom wird eine dominant erbliche Erkrankung mit multiplen Angiomen der Netzhaut und des Kleinhirns sowie mit Zystenbildung in Pankreas, Nieren und Leber bezeichnet. Ihre Ursache findet die Erkrankung in einer Überproduktion von Hypoxie-induzierbaren Genprodukten wie z.B. von VEGF [170]. Das Produkt des VHL-Tumor-Suppressor-Gens wird als pVHL bezeichnet. Die Interaktion zwischen pVHL und HIF-1 α wird durch ein Enzym reguliert, das die Hydroxilierung eines

Prolinrestes von HIF-1 α katalysiert. [245]. Dieses Enzym wurde von Jaakola et al. (2001) als HIF-Prolylhydroxylase (HIF-PH) bezeichnet [172]. Diese Prolylhydroxylase wird als direkter Sauerstoffsensor angesehen.

Ionenkanalhypothese: Es konnte eine große Vielfalt von O₂-sensitiven Ionenkanälen in verschiedenen Zelltypen (Typ I-Zellen des Glomus caroticum, PC12-Zellen, glatte Muskelzellen) nachgewiesen werden [41;226;246]. Es gibt jedoch noch keine Erkenntnis darüber, ob es sich bei den Ionenkanälen selbst um den O₂-Sensor handelt, oder ob die Veränderung der Ionenströme als Reaktion auf einen außerhalb der Ionenkanäle liegenden O₂-Sensor entsteht.

NADPH-Oxidase-Hypothese: Aufgrund ihrer Ergebnisse vermuteten Acker und Xue (1995), dass eine NADPH-Oxidase in der Lage ist, in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration H₂O₂ zu produzieren [4]. Das gebildete H₂O₂ diene als Botenstoff und reguliere die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen und die Expression von bestimmten Genen, wie z.B. EPO. Nach Acker et al. (1989), Cross et al. (1990 und 1995) enthält die NADPH-Oxidase ein Cytochrom, das starke Ähnlichkeit mit dem Cytochrom b₅₅₈ der NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten aufweist [3;58;59].

Mitochondriale ROS-Hypothese: Untersuchungen von Chandel et al. (2000) weisen daraufhin, dass die Mitochondrien einer Zelle auf Hypoxie mit einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren. Diese ROS könnten zu einer Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit führen, die wiederum eine Reihe von Genen (z.B. EPO) aktiviert [48].

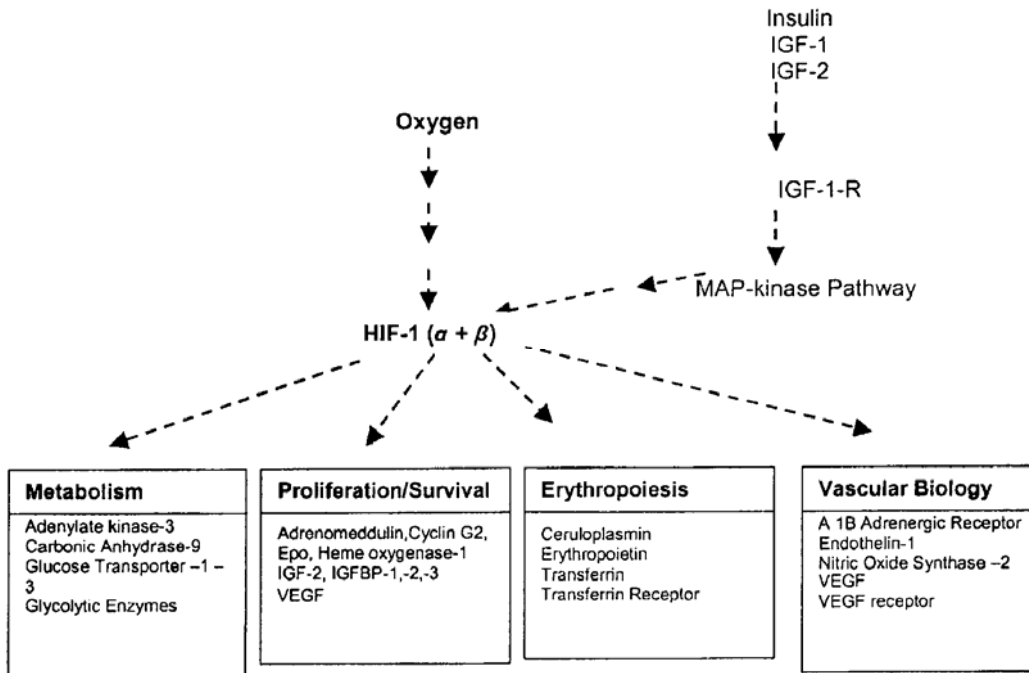


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktions-Kaskade, die zur Aktivierung von HIF-1 α und den HIF-1 α -regulierten Genen führt [318]

1.1.3 Kohlenmonoxid

Kohlenmonoxid (CO) ist ein farb- und geruchloses Gas, das die gleiche Dichte wie Luft besitzt und bevorzugt an das Eisenatom in Hämproteinen bindet. Die Affinität von CO zu Häm in Lösung ist sehr hoch (25 000fach stärker als zu O₂). Durch den Globinanteil im Hämoglobin reduziert sich die Bindungsaffinität von CO auf das 200-300fache im Vergleich zu der von O₂. So reichen bei 21 Vol % O₂ nur 0,07 Vol % CO, um die Hälfte des Hämoglobins zu besetzen (berechnet für 300fach höhere Affinität). Unter Normalbedingungen sind jedoch nur 1% der Hämoglobinbindungsstellen besetzt.

CO bindet ebenfalls mit hoher Affinität an Myoglobin (30-40fach höher als O₂) und mit geringer Affinität an Cytochromoxidasen. Bei einem pO₂ unter 60 mmHg weist CO eine höhere Affinität zum Myoglobin als zum Hämoglobin auf. Daher ist unter COHb der O₂-Partialdruck im Gewebe niedriger als bei reinem O₂-Mangel. Zudem besteht unter CO eine Linksverschiebung der Hämoglobin-Bindungskurve. D.h., dass der pO₂ im Gewebe noch weiter absinken muss, bevor O₂ aus der Hb-Bindung abgegeben wird. Die CO-Bindung ist reversibel.

Bei Abnahme des $p\text{CO}$ oder Zunahme des $p\text{O}_2$ in der Inspirationsluft nimmt die Konzentration vom COHb ab. Die Symptomatik einer CO-Intoxikation beruht auf der Gewebehypoxie und der resultierenden metabolischen Azidose, da COHb im Gegensatz zum reduzierten Hb keine sauren Valenzen abtransportiert. CO wird kaum metabolisiert und unverändert abgeatmet, kann allerdings durch die Reduktion der Cytochrom-c-Oxidase [268] oder anderer Hämproteine zu CO_2 oxidiert werden [27]. Als Kompensationsmechanismus auf die Inhalation von CO kommt es zu einer Steigerung der Katecholamin- und Kortisol-Konzentrationen im Blut [333], zu einer Steigerung von Herzfrequenz, kardialer Auswurfraction und koronarem Blutfluss [5;12].

Beim Menschen wird im venösen Blut normalerweise ein HbCO-Gehalt von 0.7-1.1 % gemessen. Davon werden ca. 0.5% endogen produziert. Endogenes CO resultiert aus dem Metabolismus von Hämoglobin zu Eisen und Biliverdin, katalysiert durch die Hämoxigenase [232] und bewirkt durch die Aktivierung der Guanylatzyklase in Gefäßmuskelzellen eine Vasodilatation [185].

Die akute Kohlenmonoxid-Exposition ist wahrscheinlich der stärkste Stimulus für die In-vivo-Produktion von Erythropoetin [183;311]. Verglichen mit einer Phenylhydrazin-induzierten hämolytischen Anämie, verursacht die Carboxyhämoglobinämie bei gleichem Sauerstoffgehalt des Blutes einen 20fach höheren Anstieg der EPO-Serumkonzentration [183]. Der stärkere Effekt von CO wird durch die erhöhte O_2 -Affinität des CO-Hämoglobins und der dadurch erschwerten O_2 -Abgabe verursacht. Der Unterschied einer CO-Hypoxie gegenüber einer hypoxischen Hypoxie liegt vor allem im verzögerten Abfall der COHb-Konzentration nach Beendigung der CO-Exposition [8].

In sehr hohen Konzentrationen oder bei langer Expositionsdauer kann durch CO die Produktion von EPO, VEGF und weiterer Gene gehemmt werden [119;120;223;255], vermutlich bedingt durch eine Inhibition von HIF-1 α [161]. Neuere Studien berichten über einen therapeutischen Effekt der CO-Inhalation in geringer Konzentration bei der Verhinderung eines Ischämie- oder Reperfusionsschadens nach Lungentransplantation [112]. Dies wird wahrscheinlich durch eine verringerte Fibrin-Ablagerung an den Gefäßwänden verursacht.

1.1.4 Teil I: Einfluss des autonomen Nervensystems auf die EPO-Sekretion

1.1.4.1 Innervation der Niere

Die ersten Hinweise für eine neurale Kontrolle der Nierenfunktion fand Claude Bernard (1859) [23]. Die Niere ist in Relation zu ihrer Größe eines der am besten innervierten Organe [126;248]. Die Niere wird von Nervenfasern aus dem Plexus coeliacus, dem thorakolumbalen Grenzstrang und renalen Ganglia innerviert, die den Wurzelsegmenten T₅ bis L₃ entspringen [248;328;337]. Die renalen Nerven erreichen den Hilus zusammen mit den Blutgefäßen und verteilen sich innerhalb der Niere entlang der interlobären, interlobulären Arterien und den Aa. arcuatae sowie den afferenten und efferenten Arteriolen. Bei der Ratte werden am Abgang der Nierenarterie von der Aorta ca. 4-8 Nervenbündel gefunden, die sich auf dem Weg zur Niere aufteilen und an Zahl zunehmen [15]. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde ein direkter Kontakt von sympathischen Nervenfasern mit der basolateralen Membran von tubulären Epithelzellen nachgewiesen [16]. Aufgrund dieser Beobachtung und weiterer Versuche [20;322] vermutete man, dass die renalen Nerven die Funktion des proximalen Tubulus direkt beeinflussen. Die Niere ist nur adrenerg, aber nicht cholinerg innerviert. Man hat in der Niere sowohl α_1 -, α_2 - als auch β_1 -Rezeptoren nachgewiesen. Die Stimulation α_1 -adrenerger Rezeptoren führt zu einer vermehrten Natriumresorption, während die Natriumausscheidung durch Aktivierung von α_2 -Rezeptoren gesteigert wird. β_1 -Adrenozeptoren sind sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Zellmembran der proximalen Tubuluszellen sowie an den Glomeruli lokalisiert [147;215]. Dagegen konnten präsynaptische β_2 -Rezeptoren nur in der Adventitia, nicht aber an den Tubuli gefunden werden [215].

Bisher wurden in der Niere zahlreiche Neurotransmitter nachgewiesen, darunter Dopamin [126], Neuropeptid Y [299] und Calcitonin Gene Related Peptid [213]. Als ein weiterer wichtiger Neurotransmitter für das renale sympathische Nervensystem wurde Noradrenalin beschrieben. Der Noradrenalin-Gehalt in der Niere sinkt nach experimenteller Denervierung um bis zu 95%. Bello-Reuss et al. (1975), DiBona et al., (1983) und Knight et al. (1989) wiesen in

perivaskulären Nerven des gesamten Nierenarterienstammes Dopamin-Beta-Hydroxylase nach, was ein weiterer Hinweis für die bedeutende Rolle von Noradrenalin bei der Innervation der Niere ist [20;69;204].

1.1.4.2 Funktionelle Konsequenzen der renalen Denervierung

Bei der Denervierung unterscheidet man zwischen einer akuten oder chronischen und einer uni- oder bilateralen Denervierung. Sowohl eine akute als auch eine chronische Denervierung führt bei Ratten zu einer Natriurese und Diurese [65;305]. Bello-Reuss et al. fanden schon vor längerer Zeit eine verminderte Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus nach akuter Denervierung, welche teilweise durch distalere Tubulusabschnitte kompensiert wurde. Diese Ergebnisse waren unabhängig von hämodynamischen Veränderungen [20]. Wang und Chan zeigten in ihrer Studie eine herabgesetzte Bikarbonat-Reabsorption im distalen Tubulus nach Denervierung [359]. Veränderungen des RBF und der GFR konnten dagegen nicht beobachtet werden [323]. Eine weitere Bestätigung der Bedeutung der renalen Innervation zeigt der Nachweis eines reno-renalen Reflexes, bei dem die Diurese nach akuter Denervierung einer Niere zur Antidiurese der kontralateralen innervierten Niere führt [68]. Jacob et al. (2003) fanden, dass Ratten mit bilateral denervierten Nierenarterien unabhängig vom Salzgehalt der Nahrung einen niedrigeren Blutdruck hatten als Kontrolltiere [173]. Dies würde bedeuten, dass die renalen Nerven einen basalen Blutdruckwert aufrechterhalten, unabhängig von der Salzzufuhr.

1.1.4.3 EPO-Sekretion nach renaler Denervierung und β -adrenerger Blockade oder Stimulation

Eine elektrische Stimulation des Hypothalamus führte zu einem Anstieg der EPO-Serumkonzentration bei Kaninchen und Rhesus-Affen [143;247]. Eine Teilresektion des Hypothalamus senkte die EPO-Serumkonzentration [142]. Dies führte zu der Hypothese, dass sauerstoffsensible Zellen im Hypothalamus die EPO-Produktion in der Niere über humorale und nervale Mechanismen

beeinflussen. Auch konnte eine Resektion der Karotissinusnerven die EPO-Serumkonzentration an verschiedenen Tiermodellen steigern [25;26;146;285]. Die Resektion der Nervi splanchnici vermochte die EPO-Serumkonzentration nicht zu beeinflussen [25;97].

Der Einfluß der peripheren Nerven auf die EPO-Sekretion wird kontrovers diskutiert. Beynon et al. (1977) fanden nach 6-stündiger Hypoxie-Exposition bei Ratten eine Woche nach bilateraler renaler Denervierung einen Anstieg der EPO-Serumkonzentration [25]. Fink und Fisher (1974) beobachteten in einem ähnlichen Versuchsmodell (5 h Hypoxie-Exposition) eine Senkung der EPO-Serumkonzentration. Nach 18-stündiger Hypoxie-Exposition konnte diese Arbeitsgruppe dagegen keine Beeinflussung der EPO-Sekretion durch die renale Denervierung feststellen[96]. In einer neueren Studie fand sich wiederum nach 4-stündiger Hypoxie-Exposition bei Ratten kein Effekt der unilateralen renalen Denervierung auf die EPO-Produktion [76]. Fink et al. (1974) demonstrierten, dass der unselektive β -Blocker Propranolol eine durch 18-stündige Hypoxie induzierte Steigerung der EPO-Produktion hemmen konnte. Allerdings konnten dieselben Autoren nach 5-stündiger Hypoxie-Exposition keinen Einfluss der β -Blockade auf die EPO-Sekretion finden. Die Kombination von β -adrenerger Blockade (Propranolol) mit bilateraler renaler Denervierung verursachte dagegen eine signifikante Senkung der EPO-Konzentration im Serum nach 5-stündiger Hypoxie-Exposition. Nach 18 h Hypoxie wurde bei gleichem Versuchsaufbau eine signifikante Erhöhung des EPO-Serumwertes gemessen [96]. In klinischen Studien wurden die EPO-Serumkonzentrationen durch Gabe von Propranolol nicht verändert [118;135]. Nach Gabe von Sympathomimetika wie Noradrenalin, selektiven β_2 -Agonisten und dem unspezifischen Rezeptoragonisten Isoproterenol konnte eine Steigerung der EPO-Sekretion bzw. der Erythropoese beobachtet werden [100;118;131;181;212]. Ibrahim et al. (1994) fanden nach Gabe des β_2 -Rezeptoragonisten Ritodrine eine Senkung der EPO-Serumkonzentration bei Rattenfeten [165]. Die Verabreichung des β_2 -Agonisten Salbutamol per inhalationem blieb dagegen ohne Einfluss auf die EPO-Serumkonzentration [22]. Ebenso scheint eine durch physischen Stress induzierte Aktivierung des

sympathischen Nervensystems die EPO-Sekretion nicht modulieren zu können [303;313].

Indirekte Hinweise für einen Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die EPO-Sekretion erbrachte die Tatsache, dass ACE-Inhibitoren die Erythrozytose nach Nierentransplantation supprimieren können [287]. ACE-Inhibitoren blockieren u.a. die Angiotensin II-vermittelte renale sympathische Aktivität und senken die Noradrenalin-Konzentration in der Niere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung der renalen Innervation und die Gabe von beta-adrenergen Rezeptoragonisten und -antagonisten widersprüchlich beschrieben wird.

1.1.4.4 Renale Wirkungen von Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) ist ein Peptidhormon (36 Aminosäuren) und findet sich in besonders hoher Konzentration in zentralen und peripheren Neuronen von Säugetieren. NPY wird zusammen mit Noradrenalin in synaptischen Vesikeln gespeichert und unter Aktivierung des Sympathikus freigesetzt [229-231]. NPY gehört zu einer Familie von Polypeptiden, die strukturell ähnlich aufgebaut sind. Dazu gehören auch Peptid YY (PYY, Gastrointestinaltrakt) und das pankreatische Polypeptid (PP) [216]. Es wird vermutet, dass NPY, PP und PYY eine gemeinsame dreidimensionale Struktur („PP-fold“) aufweisen und deshalb an die gleichen Rezeptoren binden können [243].

Die NPY-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [243]. Diese bestehen aus sieben hydrophoben Transmembran-Helices mit jeweils 20 bis 25 Aminosäureresten und agieren bevorzugt über Pertussis-Toxin-sensitive G-Proteine der G_0 - und G_1 -Familie (Abb. 4) [278]. Über diese wird dann eine Adenylatzyklase inhibiert. Zusätzlich kann NPY in manchen Zellen Ca^{++} -Kanäle aktivieren und hemmen, die Phospholipase C und möglicherweise auch Phospholipase A_2 stimulieren oder Ca^{++} aus intrazellulären Speichern freisetzen [243].

Säugetiere scheinen 4 bis 6 verschiedene NPY-Rezeptorsubtypen zu besitzen (Y_1 - Y_6), die als Y-Rezeptoren bezeichnet werden. Diese unterscheiden sich in ihrer anatomischen Lage und Funktion [243].

In der Niere wurden bisher vor allem Y_1 , Y_2 und Y_5 -Rezeptoren nachgewiesen, die an der Regulation der Nierendurchblutung beteiligt sind [31]. NPY wird in fast allen renalen sympathischen Neuronen gefunden, hauptsächlich aber in der Umgebung der Tubuli und in geringerer Menge perivaskulär [51;133;205]. Die Stimulierung renaler Nerven bewirkt die Abgabe von NPY zusammen mit Noradrenalin und ATP [229;230] aus den sympathischen Nervenendigungen, wobei Noradrenalin (über α_2 -Rezeptoren) und NPY selbst über einen positiven Feedbackmechanismus die NPY-Ausschüttung regulieren [251;276]. NPY verursacht sowohl in vitro als auch in vivo eine renale Vasokonstriktion über den Y_1 -Rezeptor ohne Beeinflussung der GFR [29;30;32]. Dies wird wahrscheinlich durch eine größere Wirkung von NPY auf das Vas efferens als auf das Vas afferens verursacht [70;272]. Unter physiologischen Bedingungen scheint NPY nur ein schwacher renaler Vasokonstriktor zu sein. Es kann aber eine durch Noradrenalin und ATP ausgelöste renale Vasokonstriktion um ein Vielfaches verstärken [275]. Weiterhin senkt NPY über den Y_1 -Rezeptor die basale Reninabgabe und inhibiert die durch β -adrenerge Stimulation ausgelöste Erhöhung der Reninsekretion [10;29;138]. Durch den Y_2 -Rezeptor kann die Na^+/K^+ -ATPase im proximalen Tubulus aktiviert werden [278;279]. Ebenso können die Wirkungen von Vasopressin auf isolierte Sammelrohre über den Y_2 -Rezeptor durch NPY antagonisiert und die Noradrenalin-Abgabe präsynaptisch inhibiert werden [71]. Die systemische Gabe von NPY bewirkt eine Diurese, Calciurese und Natriurese bei unveränderter Kreatinin-Clearance und Kalium-Ausscheidung [32]. Dies wird vermutlich über Y_5 -Rezeptoren vermittelt und kann auch durch PYY aktiviert werden [29;30;324]. NPY-Antagonisten erhöhen den basalen RBF, verändern aber nicht die basale Diurese und Natriurese. Dies lässt vermuten, dass zwar renovaskuläre, nicht aber tubuläre NPY-Rezeptoren durch endogenes NPY tonisch aktiviert werden.

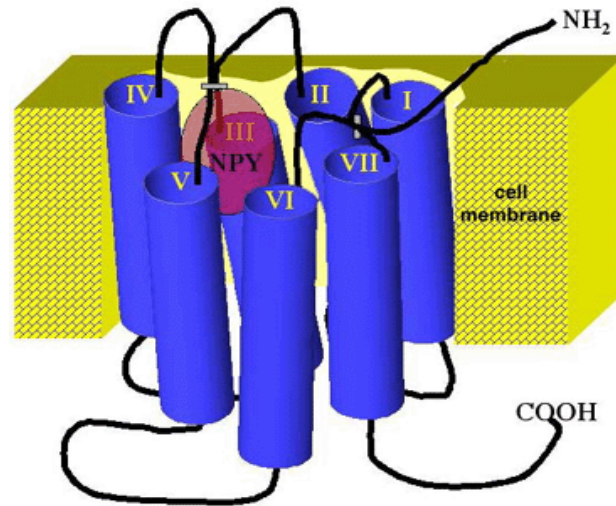


Abb. 4: Struktur des Neuropeptid Y-Rezeptors

1.1.5 Teil II: Einfluss der Reduktion des Nierengewebes auf die EPO-Sekretion

1.1.5.1 Einseitige und subtotale (5/6) Nephrektomie und deren physiologische und morphologische Auswirkungen

Patienten mit solitären oder bilateralen Nierentumoren verlieren bei der chirurgischen Therapie oftmals mehr als 50% ihrer Nierenmasse. Bei diesen Patienten erhöht sich das Risiko, eine Proteinurie, eine Glomerulopathie oder sogar ein progressives Nierenversagen zu entwickeln [274]. Die experimentelle unilaterale bzw. subtotale Nephrektomie an Tieren ist ein Modell, um die pathophysiologischen Veränderungen zu studieren, die mit einer Verringerung der renalen Masse einhergehen und wurde bereits vielfach angewendet [9;130;160;214;293;319]. Bei Ratten führt die subtotale Nephrektomie zur Urämie, zur Organhyperthrophie, zur fokalen Sklerosierung in den verbliebenen Glomeruli und zu einer progressiven Niereninsuffizienz [291;339]. Die verbleibende Restniere kann durch eine kompensatorische Hypertrophie der Tubuli den Funktionsausfall teilweise kompensieren. Biochemische Messungen zeigten eine Zunahme des zellulären Protein- und mRNA-Gehaltes, eine Zunahme des Größenverhältnisses von Mitochondrien und Zellkern und eine Steigerung der Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität [91;92]. Eine einseitige Nephrektomie

ist mit ähnlichen Adaptationsmechanismen der verbleibenden Niere assoziiert, darunter Hypertrophie, Veränderungen der glomerulären Hämodynamik und verstärkte Reabsorption im proximalen Tubulus [63;150;187;290].

1.1.5.2 Auswirkung von vermindertem Nierengewebe auf die EPO-Sekretion

Nach experimenteller Reduktion des Nierengewebes im Tierversuch konnten bereits mehrfach Veränderungen der EPO-Serumkonzentration, der EPO-mRNA und des Hämatokrits beobachtet werden [19;221;291;339]. So konnten Rosenberger et al. (2003) nachweisen, dass infarziertes Nierengewebe innerhalb einer Stunde nach Ligatur eines Nierenarterienhauptstammes die HIF-1 α -Expression zu steigern vermochte [307]. HIF-1 wiederum führt zur vermehrten Expression der Hypoxie-regulierten Gene (s.o.). Im Vergleich zu Kontrolltieren ist die Steigerung jedoch abgeschwächt [339]. Eine Steigerung der EPO-Serumkonzentration wurde auch bei chronisch niereninsuffizienten Patienten beobachtet, wenn rezidivierende Infektionen zur Hypoxie geführt hatten [49;357].

Der wichtigste Regulator für die EPO-Produktion ist der Sauerstoffpartialdruck. Allerdings ist noch unklar, wie sich eine Reduzierung des funktionstüchtigen Nierengewebes auf die Sauerstoffspannung auswirkt.

1.1.6 Teil III: Einfluss der renalen Durchblutung auf die EPO-Sekretion

1.1.6.1 Auswirkung der Ureterokklusion auf die Nierenfunktion

Ureterstenosen sind ein in der Urologie häufig anzutreffendes Krankheitsbild. Sie verursachen neben Druckatrophien mit Rarefizierung des Nierenparenchyms ca. 10% der akuten Nierenversagen. Als Leitsymptom nach Ureterokklusion findet sich eine Hydronephrose mit einer Aufweitung des Nierenbeckenkelchsystems. Dadurch bedingt kommt es zu einer Druckatrophie des Nierenparenchyms und einer chronischen interstitiellen Fibrose [168;190]. Bei akuter Harnstauung wird die Größenzunahme der Niere hauptsächlich

durch ein Ödem des Nierenparenchyms verursacht [252]. Der Pathomechanismus, insbesondere die Pathophysiologie der hämodynamischen Veränderungen bei akuten Ureterokklusionen, ist trotz zahlreicher Forschungsarbeiten bisher weitgehend ungeklärt.

Zwei Phasen charakterisieren die hämodynamische Antwort der Niere auf Ureterokklusion: Initial eine Dilatation der Gefäße mit Erhöhung des renalen Blutflusses (RBF), welche ca. 5 bis 8 Stunden später in eine anhaltende Vasokonstriktion mit Reduzierung der renalen Durchblutung übergeht [253;365]. Hierbei bestehen allerdings spezie-spezifische Unterschiede. An Schweinen konnte der initiale Anstieg des renalen Blutflusses nicht bewiesen werden [106;164]. Einige Forschungsarbeiten fanden deutliche Beweise für eine wichtige Rolle von vasodilatierenden Prostaglandinen (PGE_2) bei den initialen hämodynamischen Veränderungen der Niere nach Ureterokklusion [108;335]. Für die spätere Abnahme der Nierendurchblutung werden ebenfalls Prostaglandine, speziell Thromboxan A_2 , verantwortlich gemacht [257;353;366]. Auch eine Beteiligung von Angiotensin II [80;81;107;108;365] und Adenosin [282;298] als intrarenale Vasokonstriktoren sowie Leukotrienen, antidiuretischem Hormon [302] und Endothelin [88;194;261] als pathogenetische Faktoren an den hämodynamischen Veränderungen der hydronephrotischen Niere werden diskutiert.

1.1.6.2 Stenosierung der Nierenarterie

Die Nieren gehören zu den Organen des menschlichen Körpers mit der besten Durchblutung. Ungefähr 20% des Herzzeitvolumens durchströmen in Ruhe die Nieren, die nur etwa 0,5% der Gesamtkörpermasse ausmachen. Mit einer Perfusionsrate von 400ml/100g Gewebe pro Minute übersteigt die Durchblutung der Niere bei weitem die Werte, die in anderen gut durchbluteten Organen wie Leber, Herz oder Gehirn erreicht werden. Pro Tag durchströmen etwa 1500 Liter Blut die Nieren.

Die experimentelle unilaterale Stenosierung der Nierenarterie und deren Auswirkung auf Nierenhistologie und Hämodynamik wurden bereits vielfach untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt der durch die Stenosierung

ausgelösten renalen Hypertonie. Dabei wird durch den poststenotischen Druckabfall im juxtaglomerulären Apparat die Sekretion von Renin stark erhöht. Renin erzeugt über die Angiotensin-Aldosteron-Bildung eine Hypertonie (Goldblatt-Mechanismus) [121;122]. Für die volle Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems durch eine Nierenarterienstenose ist eine intakte renale Innervation Voraussetzung [356]. In der Niere befinden sich zahlreiche vasoaktive und inflammatorische Mediatoren. Durch die Senkung des renalen Perfusionsdruckes kommt es zur Aktivierung und zu komplexen Interaktionen dieser Substanzen. Unter anderem wird die Nitrid-Oxid(NO)-Produktion gesenkt, dagegen sind die Konzentrationen von Endothelin, Renin, Angiotensin II, Prostaglandin E₂, Prostacyclin I₂, Thromboxan A₂ und TGF-β erhöht (Abb. 5).

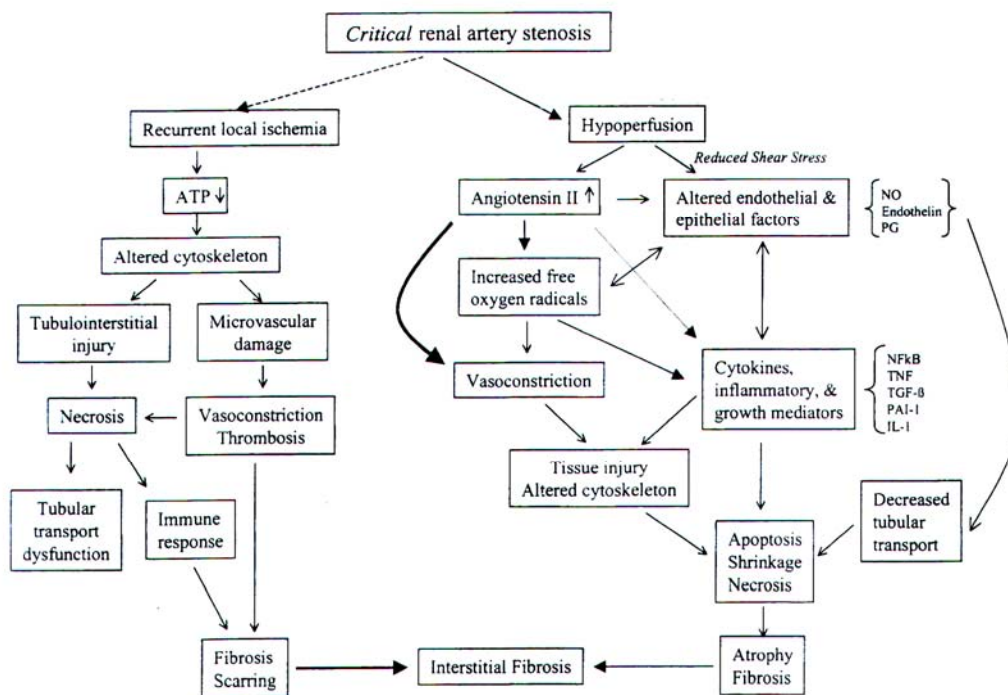


Abb. 5: Häemodynamische und morphologische Auswirkungen der Nierenarterienstenosierung [219]

1.1.6.3 EPO-Produktion nach Ureterokklusion und Nierenarterienstenosierung

Die experimentelle Ureterligatur und die Stenosierung der Nierenarterie führen zur Verminderung des renalen Sauerstoffverbrauches [64]. Abhängig von Dauer und Schweregrad der Ureterobstruktion verringert sich die glomeruläre Filtration und folglich auch die Transportarbeit der Tubuli. Bei der Verminderung des renalen Perfusionsdruck unter 80 mmHg durch eine Nierenarterienstenose wird ebenfalls die GFR und die Reabsorptionsarbeit der Tubuluszellen auf minimale Werte abgesenkt, so dass auch unter diesen Bedingungen der Sauerstoffverbrauch der Niere stark abfällt. [271]. Da die EPO-Sekretion durch Verminderung des O_2 Partialdruckes stimuliert wird, müsste durch eine nahezu vollständige Senkung der tubulären Elektrolytreabsorption durch Ureterligatur und Stenose der Nierenarterie der O_2 Partialdruck auf arteriellem Niveau bleiben.

Es ist möglich, dass der veränderte Sauerstoffverbrauch der Niere nach Ureterligatur oder Stenose der Nierenarterie Einfluß auf die EPO-Sekretion hat. In älteren Studien konnte solch ein Einfluss jedoch nicht bewiesen werden [301]. Später demonstrierten Jelkmann et al. (1988) eine unveränderte Hypoxie-induzierte EPO-Produktion in der gestauten Niere nach 4 Tagen, dagegen eine Senkung der EPO-Produktion nach dreimonatiger Ureterligatur [182]. Maxwell et al. (1997) zeigten, dass 5 bis 9 Tage nach Ligatur des Ureters die Hypoxie-induzierte EPO-Genexpression eindeutig abgeschwächt war [239]. 1 bis 2 Tage nach unilateraler Ureterligatur fanden Nečas et al (1998) einen signifikant erniedrigten EPO-mRNA-Gehalt der Nieren. Dieser Unterschied bestand jedoch nicht mehr nach 4 Tagen. Die gleiche Arbeitsgruppe beobachtete eine Erhöhung der Häm-Oxygenase-mRNA in der gestauten Niere [267]. Möglicherweise desensibilisiert das durch die Oxygenase freigesetzte Häm-Eisen die EPO-produzierenden Zellen. Eine Beteiligung von Eisen an der Regulation der EPO-Produktion wurde bereits schon früher diskutiert [87;155]. Ein genauer Mechanismus für die transiente Supprimierung der EPO-Produktion nach Ureterligatur wurde jedoch noch nicht gefunden.

Erhöhte EPO-Plasmakonzentrationen konnten bei Tieren gemessen werden, deren RBF entweder mechanisch [101;132;260;262;283;284;336] oder pharmakologisch durch Applikation von Angiotensin II [99;128], Noradrenalin, 5-Hydroxytryptamin [99;228] oder Bombesin [241] gesenkt worden war. Ein Shunt zwischen rechtem Herzvorhof und Nierenarterie vermochte die EPO-Produktion bei Hunden in 50% der Fälle ebenfalls zu steigern [286]. Eine leichte, jedoch signifikante Erhöhung der EPO-Produktion bzw. der Erythropoese wurde ebenso bei Patienten mit Nierenarterienstenose gefunden [37;355]. In einigen Fällen wurde sogar eine Erythrozytose oder Polyzythämie beobachtet [13;37;162;342]. Verglichen mit einer Anämie wirkt sich die Reduktion des renalen Blutflusses jedoch nur schwach auf die Erhöhung der EPO-Produktion aus [283]. Eine Reduktion des RBF von mindestens 50% scheint für eine Auswirkung auf die EPO-Produktion Voraussetzung zu sein [101;283]. Widersprüchlich zu obigen Daten sind einige ältere Studien. Diese Arbeitsgruppen konnten nach partieller bzw. vollständiger Ligatur der Nierenarterie unter Verwendung von Golblatt-Clips keine Veränderung der EPO-Produktion im Vergleich zu Kontrolltieren sehen [54;57;247]. Maxwell et al. (1997) demonstrierten sogar, dass die peritubulären Fibroblasten bei Ischämie der Niere das EPO-Gen vermindert exprimieren [239]. In der post-ischämischen Niere konnten eine Stunde nach experimentellem Verschluss der Nierenarterie EPO-mRNA Werte gemessen werden, die 50-67% niedriger waren als in der kontralateralen Niere [340].

1.1.7 Teil IV: EPO-Produktion in der Leber

1.1.7.1 EPO-Produktion in der fetalen und adulten Leber

Beim Foetus ist im Gegensatz zum adulten Organismus die Leber die Hauptquelle der EPO-Produktion [256]. Ein Wechsel der Erythropoese von der Leber zum Knochenmark und der Erythropoetinproduktion von der Leber zu den Nieren findet erst im Neugeborenenalter statt. Zeitpunkt und Dauer dieses Wechsels sind Spezies-spezifisch [109;288;367;368;370]. Die fetale Leber exprimiert bis zu 95% der Gesamt-EPO-mRNA [60;277]. Innerhalb der Leber

produzieren offensichtlich Hepatozyten als auch nichtparenchymatöse perisinusoidale Zellen EPO [209;240;316]. Nach dem Wechsel zur renalen EPO-Produktion produziert die Leber unter Normoxie nur noch 10-20% der gesamten EPO-Serumkonzentration [315;339;358] und ist nicht mehr in der Lage einen Verlust der renalen EPO-Produktion, z.B. beim chronischen Nierenversagen, zu kompensieren [50].

Sowohl renale als auch hepatische EPO-Produktion können durch Hypoxie induziert werden. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass die Leber unter hypoxischen Bedingungen zwischen 15 und 50 % zur Gesamt-mRNA Produktion beitragen kann [34;86;339]. Allerdings reagiert die Leber weniger empfindlich auf hypoxische Stimulation als die Niere [338].

Obwohl die fetalen Leberlappen nach Untersuchungen von Rudolph et al. (1985) unterschiedlich stark durchblutet werden, fand sich beim Menschen und bei Ratten kein Unterschied in der Verteilung der EPO-mRNA-Expression innerhalb der fetalen Leber [60;297;308]. Bislang wurde noch nicht geklärt, ob EPO plazentagängig ist oder nicht. Es besteht allerdings keine Korrelation zwischen maternalen und fetalen EPO-Konzentrationen beim Menschen [218]. Neben EPO-mRNA wurde in der Leber auch HIF-1 nachgewiesen. HIF-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der EPO-Genexpression. In der Leber werden alle α -Untereinheiten der HIF's exprimiert. HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α -cDNA wird dabei hauptsächlich im perivenösen Bereich des Leberazinus exprimiert [195]. Dort ist der pO_2 im Vergleich zum Periportalgebiet (65mmHg) stark erniedrigt (35mmHg) [188].

1.1.7.2 Durchblutung der Leber im Fetalkreislauf

Mit durchschnittlich 1500 g ist die Leber das größte Organ des Menschen und beansprucht ca. 25 % des Herzzeitvolumens. Bezogen auf die Lebermasse entspricht dies einem Blutfluß von etwa 100 ml/min/100g Lebergewebe [163]. Der portalvenöse Zufluß beträgt hiervon etwa zwei Drittel, der Zustrom über die A. hepatica ein Drittel. Bei erhöhtem Sauerstoffbedarf kann der Zufluß aus der A. hepatica verdoppelt werden. Der fetale Blutkreislauf unterscheidet sich durch drei Kurzschlussverbindungen vom adulten Blutkreislauf. Arterialisiertes Blut tritt

über die Plazenta durch die Nabelvene in den fetalen Blutkreislauf ein und fließt zum Teil, mit wenig Pfortaderblut vermischt, zur Leber, zum Teil durch den Ductus venosus Arantii an der Leber vorbei in die untere Hohlvene (mischt sich mit venösem Blut der unteren Körperhälfte) und gelangt über den rechten und via Foramen ovale linken Vorhof und Ventrikel in den großen Kreislauf. Das Blut aus der oberen Hohlvene gelangt über die rechte Herzhälfte, den Stamm der Arteria pulmonalis und den Ductus arteriosus Botalli (d.h. ebenfalls an den noch nicht funktionierenden Lungen vorbei) in die Aorta descendens. Aus der Aorta fließt das venöse Blut zum Stoffaustausch durch die Nabelschnurarterien in die Plazenta. Das zu etwa 60% mit Sauerstoff gesättigte Blut der Umbilikalarterien wird dort wieder mit Sauerstoff beladen, wobei aber nur eine Sättigung von 80% erreicht wird. Der Foetus lebt demnach in relativem Sauerstoffmangel [123]. Nach der Geburt, mit Eintreten der Lungenatmung und Fortfall des Plazentakreislaufs, erfolgt durch die Funktionsaufnahme des Lungenkreislaufs der Ventilverschluss des Foramen ovale und der Kollaps (und Verödung) des Ductus arteriosus. Dadurch kommt es zu einer Trennung der Pumpleistung beider Herzhälften. Ebenso kollabieren und veröden Nabelvene und Ductus venosus.

Der Ductus venosus ist eine Kurzschlussverbindung zwischen zwei großen Venen: der Umbilikalvene und der Vena cava inferior. Obwohl zahlreiche Studien postulierten, dass nahezu 50% des sauerstoffreichen Blutes aus der Umbilikalvene durch den Ductus venosus fließen und damit die Leber umgehen [18;79;289], zeigen neuere dopplersonographische Untersuchungen, dass das Shuntvolumen unter physiologischen Bedingungen viel geringer ist [21;201]. Der Blutfluss durch den Ductus venosus beträgt demnach durchschnittlich nur 40-60 ml/min/kg in der 20. SSW und weniger als 20 ml/min/kg bei der Geburt [201]. Der größere Teil (70 bis 80 %) des oxygenierten Umbilikalvenenblutes fließt durch die fetale Leber. In Extremsituationen scheint die Leber sogar zusätzlich durch den Truncus coeliacus versorgt zu werden [197].

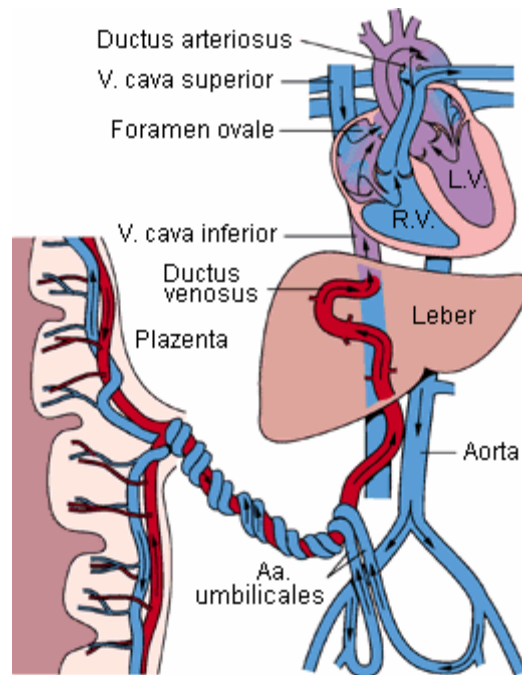


Abb. 6: Schema des fetalen Kreislaufs [1]

Die Blutversorgung von rechtem und linkem Leberlappen unterscheidet sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Hämorrhagie. Der linke Leberlappen wird fast ausschließlich mit oxygeniertem Blut aus der Plazenta versorgt. Der rechte Leberlappen erhält dagegen sauerstoffarmes Blut aus der Pfortader [308]. Ebenso bestehen funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Leberlappen. Beispielsweise enthält der rechte Leberlappen beim Fötus mehr Eisen, der linke Leberlappen hingegen mehr Fett [82].

Der Sauerstoffverbrauch in der fetalen Leber ist sehr gering. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wird bei der Passage durch die Leber lediglich um 15 % reduziert [39]. Der Blutfluss durch den Ductus venosus bzw. durch die Leber kann durch mehrere Parameter verändert werden. Erhöht sich der Hämatokrit und somit auch die Viskosität des Blutes findet eine Umverteilung zugunsten des Ductus venosus statt [202]. Unter Hypoxie oder Hypovolämie vergrößert sich ebenfalls das Shuntvolumen durch den Ductus venosus, so dass eine größere Menge oxygenierten Blutes direkt zum Herz fließt. [184;200;344]. Reduziert sich der Blutdruck in der Umbilikalvene verringert sich der Blutfluss durch die Leber stärker als durch den Ductus venosus [202]. Besonders betroffen ist hiervon der rechte Leberlappen [78]. Weiterhin scheint

Asphyxie eine stärkere Degeneration der rechten Leberhälfte zu verursachen [136]. Im Ductus venosus besteht ein adrenerg kontrollierter Ruhetonus, der sich unter dem Einfluss von NO [200], Prostaglandinen [53;254] und unter Hypoxie [200] verringert und somit eine Erweiterung des Gefäßes verursacht. Der Ductus venosus obliteriert bei 75 % der Neugeborenen innerhalb einer Woche postpartem. Bei den restlichen 25 % verschließt sich der Ductus in den nächsten 10 bis 14 Tagen [110;224;225]. Bei Frühgeborenen bleibt der Ductus venosus länger geöffnet [111;225].

1.1.8 Teil V: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und EPO-Synthese

1.1.8.1 Grundlagen

Das Renin-Angiotensin-System (Abb. 7) ist neben dem sympathischen Einfluss wichtig zur Regulation des Blutdrucks. Zusätzlich spielt es die entscheidende Rolle bei der Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts des Menschen. Angiotensin II stellt dabei den eigentlichen biologischen Effektor des Systems dar. Es wirkt vasokonstriktorisch durch direkte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und erhöht die Aktivität des Sympathikus sowie die Na⁺-Rückresorption in den Nierentubuli. Ferner inhibiert Angiotensin II die Reninsekretion und stimuliert in der Nebennierenrinde die Ausschüttung und Synthese des Steroidhormons Aldosteron. Aldosteron führt letztlich im distalen Nierentubulus zu einer verstärkten Rückresorption von Na⁺ und Wasser und erhöht dadurch das Blutvolumen und den Blutdruck [139]. Das RAAS wird im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus reguliert, d.h. sowohl ein erhöhter Blutdruck als auch eine erhöhte Kochsalzkonzentration hemmen die Reninfreisetzung und Reninsynthese. Auch Angiotensin II übt, wie unten aufgeführt, einen direkt hemmenden Effekt auf die Reninsekretion aus [139].

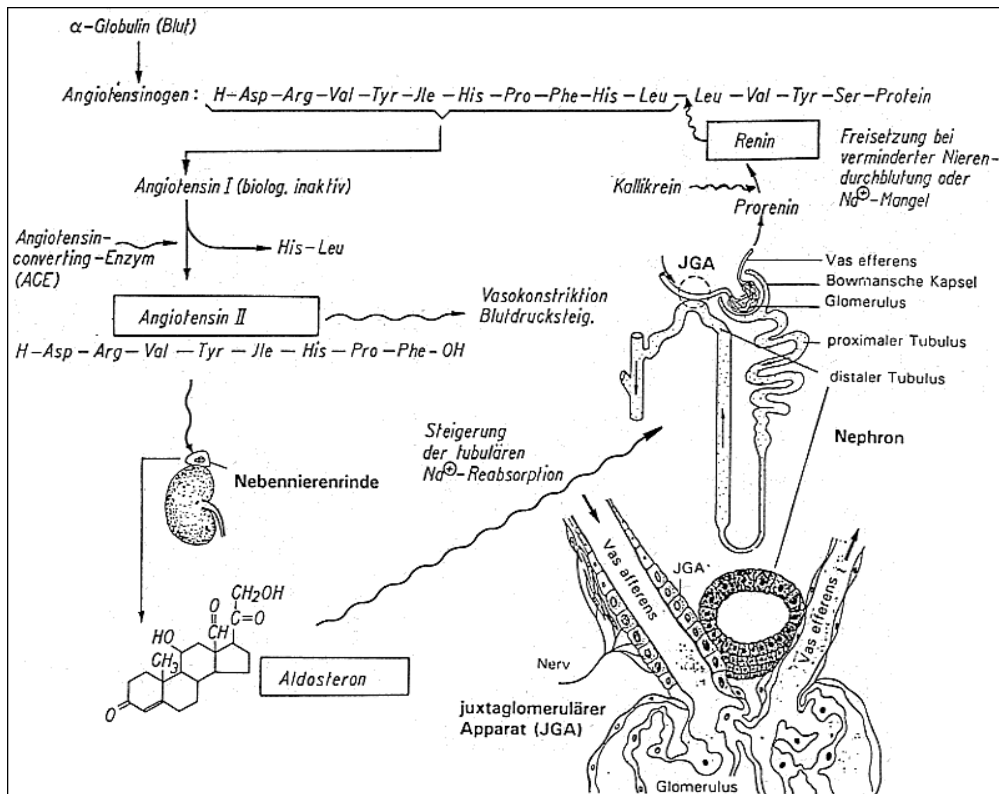


Abb. 7: Übersicht über die Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems

Die Auswirkungen von Sauerstoffmangel auf die Renin-Sekretion sind noch weitgehend unklar. Bisherige Forschungsarbeiten sind widersprüchlich und Daten über die Renin-Genexpression unter Hypoxie sind rar. Dass eine Hypoxie-Exposition einen Anstieg der PRA bzw. der Renin-Genexpression in vivo nach sich zieht, konnten Neylon et al. (1996) nach 20minütiger Hypoxie-Exposition (12 % O_2) sowie Krämer et al. (1998) nach 6-stündiger Hypoxie-Exposition (8 % O_2 oder 0,1 % CO) und Fletcher et al. (1999) nach 35-tägiger Hypoxie-Exposition (7 h/d) an Ratten nachweisen [102;210;270]. Bei bilateral an der Nierenarterie denervierten Tieren blieb diese Erhöhung aus [102]. Diese Ergebnisse konnten in vitro nicht reproduziert werden. Krämer et al. (1998) und Ritthaler et al. (1997) konnten an Kulturen mit juxtaglomerulären Zellen keine Veränderung der Plasmareninsekretion nachweisen [210;304]. Auch beim Menschen hatte hypobare Hypoxie keine Einfluss auf die Renin-Sekretion [206]. Messungen von Schweda et al. (2000) hingegen ergaben, dass chronische Hypoxie-Exposition zu einer Supprimierung der Renin-Genexpression führt [317]. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die

Wirkungen von Hypoxie auf die Renin-Sekretion von Dauer und Höhe des hypoxischen Stimulus, von der renalen Innervierung und vom Natriumgleichgewicht abhängig zu sein scheinen [192;331;351].

Mehrfach wurde nachgewiesen, dass sowohl Renin als auch Angiotensin II die renale und extrarenale EPO-Sekretion stimulieren können [7;99;105;127;128]. Ebenso bewirkt die Gabe von ACE-Inhibitoren eine Senkung der EPO-Sekretion [117;189]. Die meisten Autoren verneinen jedoch einen direkten Zusammenhang zwischen der Renin-Sekretion und der EPO-Synthese [2;73;157;244;369]. Es wird angenommen, dass ein gleichzeitiger Anstieg von PRA und EPO-Produktion ein indirekter Effekt ist und einen evtl. darunter liegenden stimulatorischen Effekt überdeckt. Ob allerdings die Stimulierung der EPO-Sekretion durch eine Reduktion des RBF und folglich eine ischämische Hypoxie oder durch andere Mechanismen ausgelöst wird, muss noch genauer untersucht werden.

1.2 Eigene Fragestellung

Es ist bekannt, dass Erythropoetin unter Hypoxie durch Hypoxie-induzierbare-Faktoren (HIF) hochreguliert wird. Bis heute ist aber nicht geklärt, ob andere Mechanismen eine Rolle bei der renalen EPO-Produktion und -Sekretion unter Hypoxie spielen.

(I) Es wird in der Literatur kontrovers diskutiert, inwieweit das autonome Nervensystem und seine Transmitter, die Gewebemenge oder die Durchblutung der Niere die renale EPO-Sekretion regulieren. Im ersten Teil der Arbeit wurden die EPO-Konzentration im Serum und die renale EPO-mRNA nach renaler Denervierung und Gabe von Propranolol, Isoproterenol, Neuropeptid Y und dem Neuropeptid Y-Antagonist nach CO-Exposition untersucht.

(II) Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß der renalen Gewebemenge und der Durchblutung auf die EPO-Produktion untersucht. Die Tiere wurden vor CO-Exposition unilateral oder subtotal nephrektomiert.

(III) Die Durchblutung der Niere wurde vor CO-Exposition durch arterielle Stenosierung oder akute und chronische Ureterligatur verändert.

(IV) Im vierten Teil der Arbeit wurde geprüft, ob durch Arterialisierung der Leber über einen porto-renalen Shunt die EPO-mRNA-Expression in der Leber verändert werden kann.

(V) Der fünfte Teil der Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen von Hypoxie auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.

2 Material und Methodik

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei allen Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 280-320 g (Charles River GmbH, Sulzfeld) verwendet. In der Tierhaltung herrschte ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von 12/12 h. Die Raumtemperatur betrug 21°C, die Luftfeuchtigkeit 60%g/m³. Die Tiere hatten freien Zugang zu pelletierter Standard-Nahrung der Fa. Altromin (Altromin, Haltung, C1324, Altromin GmbH, Lage) und zu Leitungswasser.

2.2 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden 7 Tage bzw. 14 Tage vor CO-Exposition operiert. Medikation wurde 30 min. vor CO-Exposition intraperitoneal injiziert oder über Alzet[®]-Pumpen intravenös infundiert, welche 12 Stunden vor der CO-Exposition implantiert wurden. Um die Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, erhielten Tiere mit intraperitonealer Medikation zusätzlich 0,85 % NaCl intravenös verabreicht (Alzet[®]-Pumpe) und umgekehrt Tiere mit intravenöser Medikation über Alzet[®]-Pumpen eine intraperitoneale Injektion von 0,85 % NaCl.

Die Tiere wurden in einem speziell angefertigten Hypoxie-Kasten mit CO begast (0-0,12 Vol % CO). Anschließend wurde über die Vena cava Blut entnommen, sowie beide Nieren und die Leber explantiert.

Folgende Parameter wurden nach 4-stündiger CO-Exposition untersucht:

- EPO-Serumkonzentration
- EPO-mRNA in Leber-und Nierengewebe
- Noradrenalin- und Adrenalingehalt im Nierengewebe
- Plasma-Renin-Aktivität (PRA)

Die Versuchsgruppen im ersten bis vierten Teil der Arbeit stellen sich wie folgt dar:

Teil I: Einfluss des autonomen Nervensystems auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

1. **DNX:**
renale Denervierung beidseits (n=39)
2. **INN:**
Kontrollgruppe zur renalen Denervierung und zu Teil II (NX, NXX), (n=58)
3. **V-DNX:**
renale Denervierung und Kontrollgruppe zur Applikation von Substanzen über eine Alzet-Pumpe und i.p. Injektionen (n=7)
4. **I-DNX:**
renale Denervierung beidseits und Gabe von Isoproterenol (0,3 µg/min/kg) über eine Alzet[®]-Pumpe (n=5)
5. **N-DNX:**
renale Denervierung beidseits und Gabe von NPY (0,3 µg/min/kg) über eine Alzet[®]-Pumpe (n=6)
6. **V-INN:**
Kontrollgruppe zur renalen Denervierung und zur Applikation von Substanzen über eine Alzet-Pumpe und i.p. Injektionen (n=8)
7. **P-INN:**
Kontrollgruppe zur renalen Denervierung und Gabe von Propranolol (4mg/kg i.p.) (n=6)
8. **NA-INN:**
Kontrollen zur renalen Denervierung und Gabe von Neuropeptid Y-Antagonist (0,5µg/min/kg, Alzet[®]-Pumpe) (n=5)

Teil II: Einfluss der renalen Gewebemenge auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

1. **NX:**
Nephrektomie der rechten Niere (NX), Kontrollen zu NXX und allen Gruppen des Teil III (n=20)
2. **NXX:**
2/3-Nephrektomie der linken Niere und Nephrektomie der rechten Niere am 7. postoperativen Tag (n=15)

Teil III: Einfluss der renalen Durchblutung auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

1. **UL0,5:**
Nephrektomie der rechten Niere, 30 Minuten vor CO-Exposition Ligatur des linken Ureters und i.v. Gabe des Osmodiuretikums Mannitol (n=4).
2. **UL24:**
Nephrektomie der rechten Niere, 24 Stunden vor CO-Exposition Ligatur des linken Ureters (n=6).
3. **ST:**
Nephrektomie der rechten Niere und Stenosierung der linken Nierenarterie am 7. postoperativen Tag (n=10).

Teil IV: Einfluss der Leber-Arterialisierung auf die CO-stimulierte hepatische EPO-Sekretion

1. **INN (Niere):**
Messung der EPO-mRNA in der Niere nicht operierten Tieren (n=35).
2. **INN (Leber):**
Messung der EPO-mRNA in der Leber bei nicht operierten Tieren (n=22).
3. **ART:**
Arterialisierung der Leber über reno-portalen Shunt und Nephrektomie der rechten Niere (n=23)

4. K-ART:

Kontrollen zur Gruppe ART mit Nephrektomie der rechten Niere und Ligatur des Zuflusses der V. gastrica sinistra zur V. portae (n=7)

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Narkosen

2.3.1.1 Ketamin/Rompun-Narkose

Alle Versuche wurden mit nicht nüchternen Versuchstieren durchgeführt. Ketamin (Ketamin Curamed, CuraMED Pharma GmbH Karlsruhe) wurde in einer Dosis von 70 mg/kg Körpergewicht und Xylazin (Rompun 2%, Bayer Vital, Leverkusen) mit 15 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

2.3.1.2 Diethylether-Narkose

Der Boden eines Glasgefäßes wurde mit mehreren Tupfern (Tupfer, Zelletten, Lohmann) ausgelegt und mit einigen Tropfen Diethylether (Merck, Darmstadt) benetzt. Das Tier wurde dann in das Glasgefäß gesetzt. Bereits nach wenigen Sekunden setzte die sedierende Wirkung des Diethylethers ein. Da die narkotisierende Wirkung des Ethers sehr schnell nachlässt, wurde zur Aufrechterhaltung der Narkose bis zum Versuchsende eine Spritze (Plastipak[®] Spritzen, 10ml, Becken Dickinson S.A., Spanien), die mit diethylethergetränkten Tupfern gefüllt war, in Höhe der Schneidezähne des Tieres platziert.

2.3.2 Teil I: Präparationen und zeitlicher Versuchsablauf

2.3.2.1 Denervierung

Die Tiere wurden auf einem geheizten Präparationstisch gelagert (Typ: RT, Effenberger, medizinisch-technischer Gerätebau, Pfaffing/Attel). Die Körpertemperatur der Tiere wurde konstant bei 37,2°C gehalten, kontrolliert

durch eine rektale Temperatursonde (Effenberger, medizinisch-technischer Gerätebau, Pfaffing/ Attel). Nach einem abdominellen Medianschnitt und Fixierung der Bauchwand wurden Magen und Darmkonvolut mobilisiert, zur Seite gedrängt und mit einem angefeuchteten Tupfer (0,85 % NaCl) und Parafilm gegen Austrocknung geschützt. Die Nierenarterie wurde unter stereomikroskopischer Sicht (Leica Stereomikroskop MZ 9-5, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) stumpf freipräpariert und von Bindegewebe und Nerven befreit. Um die restlichen Nervenfasern zu inaktivieren wurde die Arterie dreimal mit zehnprozentiger Phenol-Lösung in Ethanol betupft. Das Operationsgebiet wurde anschließend mit Natriumchloridlösung gespült, um die Phenol-Wirkung auf die Nervenfasern zu beschränken. Nun wurde die rechte Niere auf die gleiche Weise freigelegt und denerviert. Nach erfolgreicher Denervierung wurden die Baucheingeweide reponiert und die Operationswunden verschlossen. Die gesamte Bauchmuskulatur mit Faszien und Peritoneum wurde durch eine fortlaufende Naht mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl violett geflochten 4/0, EthilNN, Norderstedt) verschlossen. Die Haut wurde ebenfalls durch eine fortlaufende Naht (Faden: Vicryl ungefärbt geflochten 3/0, EthilNN, Norderstedt) zugenäht. Die Präparationszeit betrug insgesamt 45 min.

An **scheinoperierten** Tieren wurden unter gleicher Narkose und mit gleicher Präparationsdauer alle Eingriffe außer der manuellen und pharmakologischen Zerstörung der renalen Nervenfasern durchgeführt.

2.3.2.2 Implantation von osmotischen Mikropumpen

Zur kontinuierlichen Applikation von definierten Mengen an Testsubstanz über mehrere Stunden wurden osmotische Alzet[®]-Pumpen (Modell 1003D, DURECT Corporation, Cupertino, CA) 12 Stunden vor Versuchsbeginn subkutan implantiert. Unter einer Diethylether-Narkose wurde ein 2 bis 3 cm langer suprasternaler links-paramedianer Hautschnitt gesetzt und mit einer Schere stumpf nach lateral zu einer subkutanen Hauttasche erweitert, welche die 1,5 × 0,6 cm große Pumpe aufnehmen konnte.

Die Pumpen waren zuvor entsprechend der Gebrauchsanweisung steril mit der Testlösung gefüllt und die exakte Füllung anschließend überprüft worden. Auf die Alzet[®]-Pumpe wurde dann ein Polyethylen (PE)-Katheter mit einem Innendurchmesser von 0,58 mm und einer Länge von ca. 3 cm aufgesetzt. Die Pumpe wurde daraufhin für mindestens 6 h bei 37 °C in ein Gefäß mit steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung gestellt, um vor der Implantation eine Pumprate von 1.0 µl/h sicherzustellen.

Nach Präparation der Vena jugularis externa wurde der PE-Katheter (0,58 × 0,96mm) auf der Alzet[®]-Pumpe ca. 1,5 cm herzwärts in die Vene vorgeschoben. Nach sorgfältigem Einbinden des Katheters kaudal der Inzisionsstelle (Faden: Silk Seide, AUT: 798, S.M.I. AG, Hünningen, Belgien) wurde die Wunde verschlossen (Faden: Vicryl ungefärbt geflochten 3/0, EthilINN, Norderstedt). Die Präparationsdauer betrug 3-5 min.

Es folgt zur Verdeutlichung der zeitliche Ablauf des Versuchs:

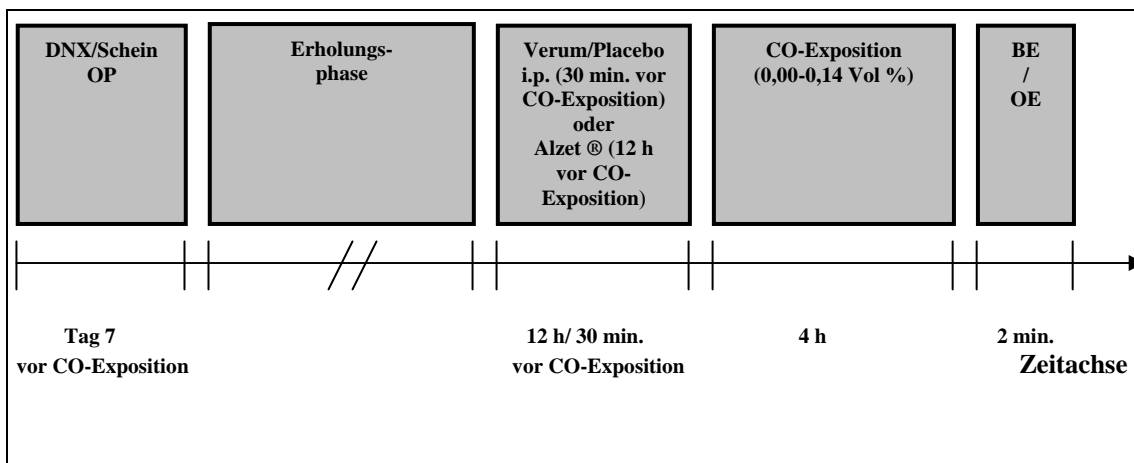


Abb. 8: Zeitlicher Versuchsablauf Teil I: 7 Tage vor CO-Exposition beidseitige renale Denervierung, bzw. Schein-Operation, 12 h/30 min vor CO-Exposition Implantation von Alzet[®]-Pumpen bzw. i.p. Gabe von Verum oder Placebo, CO-Exposition je nach Versuchsgruppe bei 0,00-0,12 Vol % CO; BE, Blutentnahme; OE, Organentnahme; DNX, bds. Denervierung der Nierenarterie

2.3.3 Teil II: Präparation und zeitlicher Versuchsablauf

2.3.3.1 Einseitige Nephrektomie

Die Tiere erhielten eine Ketamin/Rompun-Narkose. Die rechte Niere wurde freigelegt und unter Schonung der Nebenniere nach Ligatur des Ureters und der Gefäße entnommen. Die Baueingeweide wurden reponiert und die Operationswunde verschlossen. Das Tier blieb bis zum Nachlassen der Narkose auf dem geheizten Präparationstisch. Die Operationsdauer betrug insgesamt 15 min.

2.3.3.2 Subtotale (5/6) Nephrektomie

Die subtotale Nephrektomie wurde in zwei Operationsschritten im Abstand von sieben Tagen durchgeführt: Zunächst wurden zwei Drittel der linken Niere 14 Tage vor CO Exposition unter Ketamin/Rompun Narkose durch die Ligatur von 1 bis 3 Ästen der Nierenarterie von der Durchblutung abgeschlossen. Dafür wurde der Nierenhilus mit den Hauptverzweigungen der Arteria renalis freipräpariert. Mit einer Gefäßklemme wurden zunächst einzelne Äste für 3 bis 5 Sekunden abgeklemmt, um die Größe des Infarktgebietes abschätzen zu können. Dieses wurde durch eine Weißfärbung des Nierengewebes deutlich erkennbar. Dann wurden entsprechenden Nierenarterienäste mit einem Faden angeschlungen und ligiert (Silk Seide, AUT: 798, S.M.I. AG, Hünningen, Belgien). Die Präparationszeit betrug insgesamt 30 min.

In einem zweiten chirurgischen Eingriff nach sieben Tagen unter Ketamin/Rompun Narkose wurde die rechte Niere unter Schonung der Nebenniere entfernt.

Es folgt zur Verdeutlichung der zeitliche Ablauf des Versuchs:

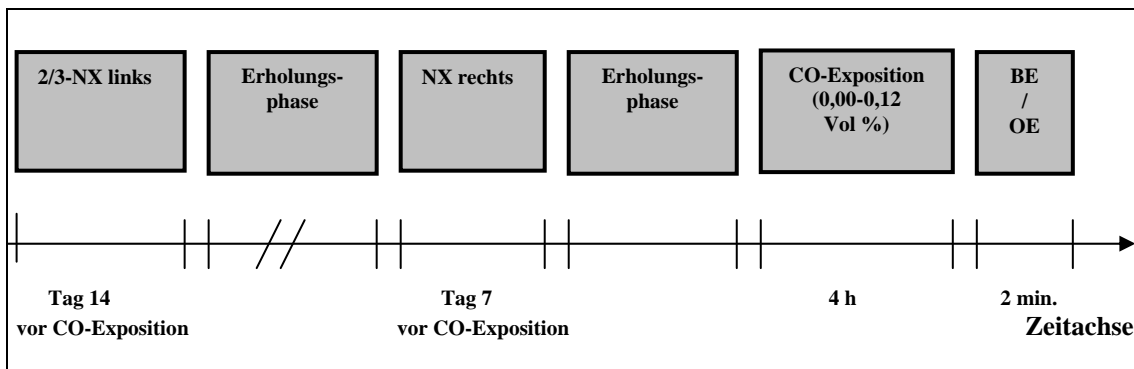


Abb. 9: Zeitlicher Versuchsablauf Teil II: 14 Tage vor CO-Exposition 2/3-Nephrektomie links, 7 Tage vor CO-Exposition Nephrektomie rechts, CO-Exposition bei 0,04-0,12 Vol % CO; BE, Blutentnahme; OE, Organentnahme; NX, Nephrektomie

2.3.4 Teil III: Präparationen und zeitlicher Versuchsablauf

2.3.4.1 Ureterligatur

Zunächst wurde unter Ketamin/Rompun-Narkose eine einseitige Nephrektomie der rechten Niere durchgeführt (s.u. 2.3.3.1). Am siebten (bzw. sechsten) postoperativen Tag wurde 30 min. oder 24 Stunden vor CO-Exposition unter Diethylethernarkose (beschrieben unter 2.3.1.2) der linke Ureter ligiert. Nach vorsichtiger, stumpfer Präparation des Nierenhilus wurde der Ureter aufgesucht, freipräpariert und auf einer Strecke von ca. 1 cm dargestellt. Der Ureter wurde dann ca. 50 mm distal des Nierenbeckens angeschlossen und ligiert (Faden: Silk Seide, AUT: 798, S.M.I. AG, Hünningen, Belgien). Nach dem Reponieren der Baueingeweide und dem Verschließen der Operationswunden wurden 1 ml Mannitol (Mannit-Lösung 20%, Serag-Wiessner GmbH&Co.KG, Bayern) über die Schwanzvene injiziert. Die mit Diethylether gefüllte Spritze wurde dann entfernt und die Tiere verblieben auf dem Wärmetisch, bis die Narkose nachließ (ca. 2 bis 4 min. nach Entfernen des Diethylethers). Die Präparationsdauer betrug etwa 5 bis 7 min.

2.3.4.2 Stenosierung und Flowmessung an der Nierenarterie

Die Tiere erhielten eine Ketamin/Rompun-Narkose. Nach vorsichtiger stumpfer Präparation des Nierenhilus wurde die Niere, um sie zu fixieren, in einer Nierenschale gelagert. Dann wurde ein Flowkopf (Blutflussmesskopf, Modell EP 102.5, Schlag GmbH, Bergisch Gladbach) mit 1.2 bis 1.4 mm Innendurchmesser um die Nierenarterie gelegt und mit einem elektromagnetischen Blutflussmessgerät (Electromagnetic Flowmeter, Modell FM 501, Carolina Medical Electronics, U.S.A.) zur renalen Blutflussmessung (RBF) verbunden (Abb. 11). Das elektromagnetische Blutflussmessgerät leitete die Blutflussregistrierungen weiter zum Schreibgerät (WeKa graph, Modell WK-280R, WKK, CH-Kattbrunn, CH), auf dem kontinuierlich die renalen Blutflussmessungen aufgezeichnet wurden. Zur Erdung wurde eine kleine Klemme am Musculus rectalis befestigt und mit dem elektromagnetischen Blutflussmessgerät verbunden. Die Eichung des Null-Flusses wurde durch Abklemmen der Nierenarterie mit einer Gefäßklemme bestimmt.

Nach Abschluss der Präparation folgte eine 20-minütige Äquilibrationsphase. Dabei wurde die Bauchhöhle mit feuchten Tupfern und Parafilm abgedeckt, um Flüssigkeitsverluste zu vermeiden. Nachdem sich der renale Blutfluss stabilisiert hatte, folgte die Stenosierung der Nierenarterie: Proximal des Flowkopfes wurde an der Nierenarterie eine selbst hergestellte Metallklemme angebracht. Diese bestand aus einem Aluminiumstreifen (Länge 3 mm, Breite 1 mm), der in der Mitte durchgebogen wurde. Daraufhin wurden unter ständiger Beobachtung des renalen Blutflusses die beiden Enden der Metallklemme mittels einer Pinzette einander angenähert. Dadurch verringerte sich der Durchmesser von Metallklemme und Arterie. Dieser Vorgang wurde gestoppt, sobald das Blutflussmessgerät eine Verringerung des Blutflusses auf 30% des Ausgangswertes verzeichnete. Dann wurde der Flowkopf entfernt, die Baueingeweide reponiert und die Operationswunden verschlossen. Die Tiere verblieben auf dem Wärmetisch, bis die Narkose nachließ. Die Präparationsdauer betrug insgesamt 90 min. 7 Tage nach Abschluss der Stenosierung wurde bei diesen Tieren eine Nephrektomie der rechten Niere durchgeführt. Diese Präparation wurde bereits unter 2.3.3.1 beschrieben.

Es folgt zur Verdeutlichung der zeitliche Ablauf des Versuchs:

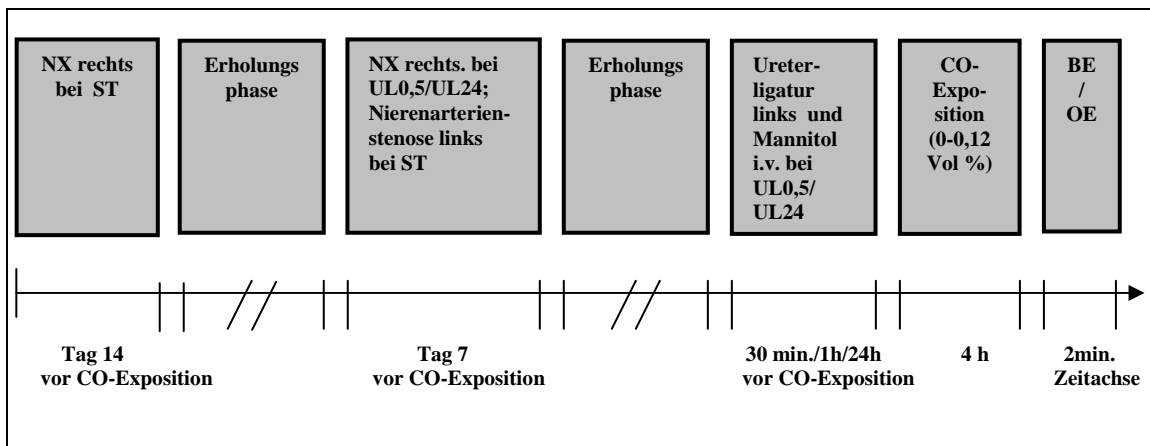


Abb. 10: Zeitlicher Versuchsablauf Teil III: 14 Tage vor CO-Exposition Nephrektomie rechts bei ST-Gruppe, 7 Tage vor CO-Exposition Nephrektomie rechts bei UL-Gruppen, 30 min/24 h Ureterligatur links bei UL-Gruppen, CO-Exposition bei 0,04-0,12 Vol % CO; BE, Blutentnahme; OE, Organentnahme; UL 0,5, akute Ureterligatur; UL24, chronische Ureterligatur; ST, Nierenarterienstenose; NX, Nephrektomie

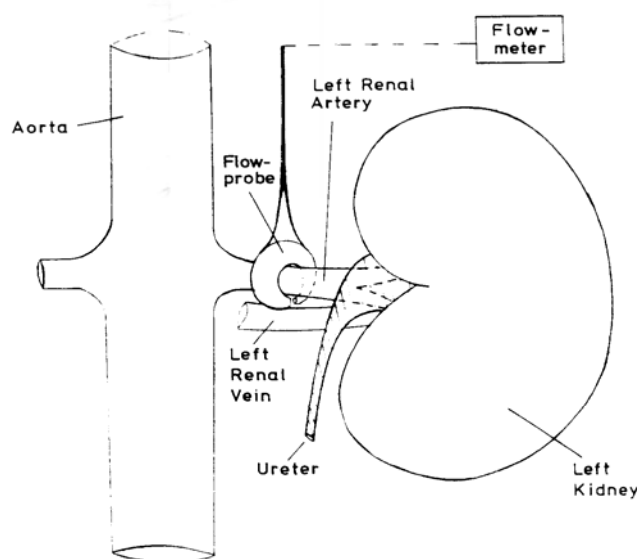


Abb. 11: Schematische Darstellung der elektromagnetischen Blutflussmessung mit dem Blutflussmesskopf um die linke Nierenarterie

2.3.5 Teil IV: Präparation und zeitlicher Versuchsablauf

2.3.5.1 Arterialisierung der Leber

Die Oxygenierung des sauerstoffarmen und nährstoffreichen Pfortaderblutes wurde nach der von Shimizu et al. (2000) beschriebenen Methode durchgeführt [320] (Abb. 13). Die Tiere wurden gewogen, narkotisiert (Ketamin/Rompun Narkose) und auf einem beheizten Präparationstisch (Effenberger, medizinisch-technischer Gerätebau, Pfaffing/Attel) gelagert. Das Fell wurde mit Paraffinöl geglättet und die Bauchdecke eröffnet. Dann wurde das Darmkonvolut zur Seite gedrängt und die rechte Niere freigelegt.

Diese wurde mit stumpfer Präparation unter Schonung der Gefäße und der Nebenniere von prärenalem Fettgewebe und bindegewebigen Verwachsungen befreit und mobilisiert. Es folgte die Darstellung von Arteria renalis, Vena renalis und Ureter. Dieser wurde stumpf präpariert und auf einer Strecke von ca. 1 cm dargestellt. Nachdem das distale Ende des Ureters ligiert worden war (Faden: Silk Seide, AUT: 798, S.M.I. AG, Hünningen, Belgien), folgte der Ligatur die Durchtrennung.

Die Nierenarterie wurde weit distal ligiert, die Vene dagegen proximal. Nachdem die Nierengefäße durchtrennt worden waren, konnte die Niere entnommen werden. Die linke Nierenarterie wurde nun in ihrem gesamten Verlauf bis zu ihrem Ursprung aus der Aorta abdominalis dargestellt und mobilisiert. Dann wurde der Gefäßstumpf der Arteria renalis proximal mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und die zuvor gesetzte distale Ligatur entfernt, so dass ein Polyethylen-Katheter (Polythene Tubing, 0,58 mm ID, 0,96 mm OD, SIMS Portex Ltd, UK) in die Vene eingebracht werden konnte. Die Gefäßklemme wurde zunächst belassen. Dann wurde die Vena portae am dorsalen Rand des Ligamentum hepatoduodenale aufgesucht und etwa 2 cm vor ihrem Eintritt in die Leberpforte von Arteria hepatica und Ductus choledochus getrennt. Es wurde die Mündung der Vena gastrica sinistra in die Vena portae freipräpariert. Die Vena gastrica sinistra wurde distal ligiert und proximal angeschlungen. Proximal des angeschlungenen Fadens wurde die Vene mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und konnte so inzidiert werden. Es wurde nun das andere Ende des Polyethylen-Katheters in die Vene

eingbracht. Die Gefäßklemme wurde gelöst und der Katheter unter mikroskopischer Sicht 1 cm vorgeschoben und anschließend durch Zuziehen des angeschlungenen Fadens fixiert.

Die Gefäßklemme auf der Arteria renalis wurde nun gelöst und das oxygenierte Blut aus der Arteria renalis konnte über die Polyethylen-Kanüle und die Vena gastrica sinistra in die Vena portae und in die Leber strömen.

Zum Schluss wurden die Baueingeweide reponiert und die Operationswunden verschlossen. Die Tiere verblieben auf dem Wärmetisch, bis die Narkose nachließ. Die Präparationsdauer betrug insgesamt 45 min. Am siebten postoperativen Tag erfolgte die CO-Exposition.

Es folgt zur Verdeutlichung der zeitliche Ablauf des Versuchs:

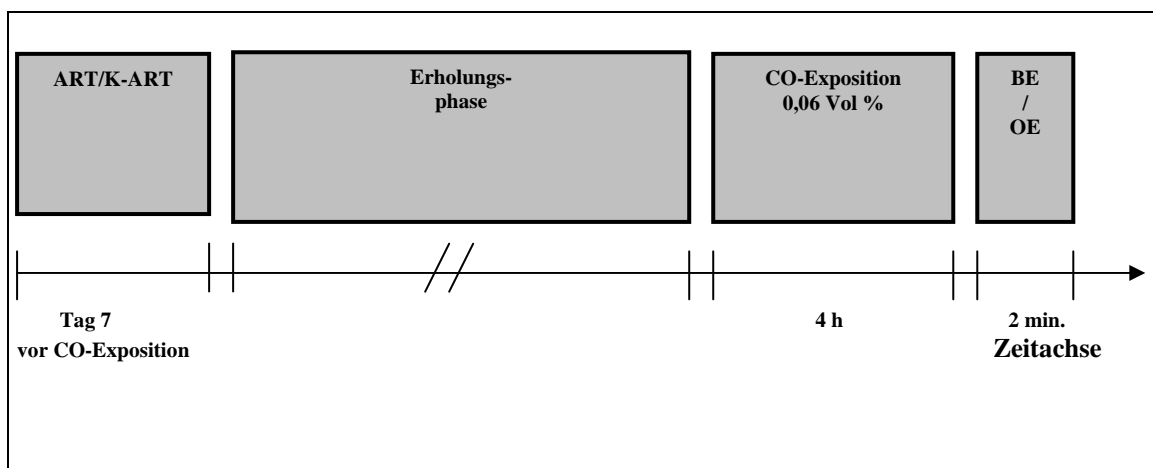


Abb. 12: Zeitlicher Versuchsablauf Teil IV: 7 Tage vor CO-Exposition Pfortaderarterialisierung bzw. Schein-OP, CO-Exposition bei 0,06 Vol % CO; BE, Blutentnahme; OE, Organentnahme; ART, Pfortaderarterialisierung; K-ART, Kontrollgruppe

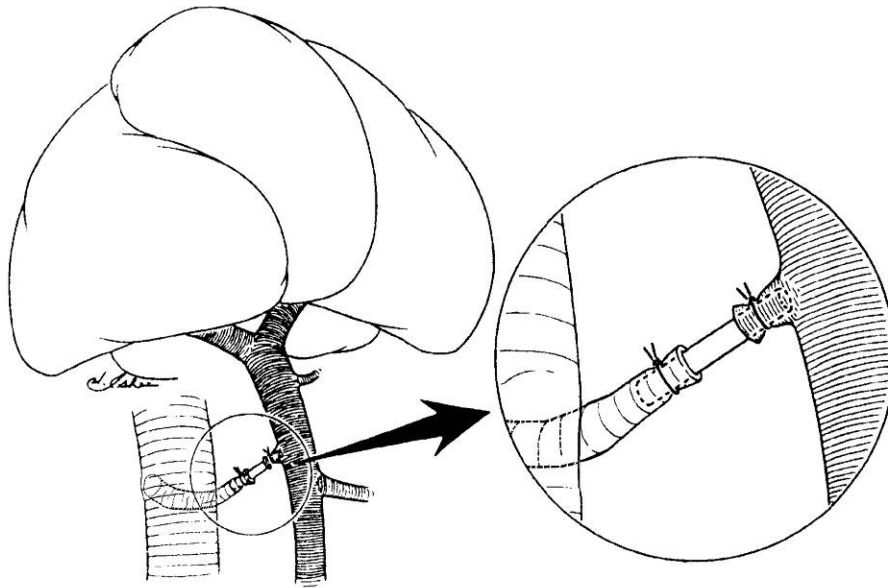


Abb. 13: Schematische Darstellung des reno-portalen Shunts. Der Katheter dient als Verbindung zwischen Nierenarterienstumpf und Pfortaderast (modifiziert nach Shimizu et al., 1999)

2.3.6 Probengewinnung

Unmittelbar nach CO-Exposition erhielten die Tiere eine Diethylether-Narkose. Blutprobe wurden über die Vena cava entnommen. Danach wurden die Tiere durch Ausbluten getötet. Die Blutprobe wurde sofort in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Gefäß (2 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt, bei 4000 U/min zentrifugiert und bei -80°C tiefgefroren.

Nach der Blutabnahme und dem Entbluten des Tieres wurden die Niere und Teile der Leber entnommen, um die EPO-mRNA-Expression in Leber- und Nierengewebe untersuchen zu können. Die Nieren wurden halbiert. Dabei wurde jeweils eine Hälfte in Einbettkassetten (Universal, gelb, R. Langenbrinck, Emmendingen) überführt und in Roti[®]-Histofix (Formaldehydlösung 4,5%, säurefrei, pH 7, Carl Roth, Karlsruhe) gelagert, um im Pathologischen Institut der Universität Tübingen in Paraffin eingebettet zu werden. Die andere Hälfte wurde in PP-Röhrchen (Cryo, S., PP-Röhrchen, 2 ml, 12.5/38 mm, Greiner, Frickenhausen) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die tiefgefrorenen Gewebe wurden bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung (EPO

mRNA, Noradrenalingehalt) gelagert. Ebenso wurde mit dem Lebergewebe verfahren.

2.3.7 Hypoxiekasten

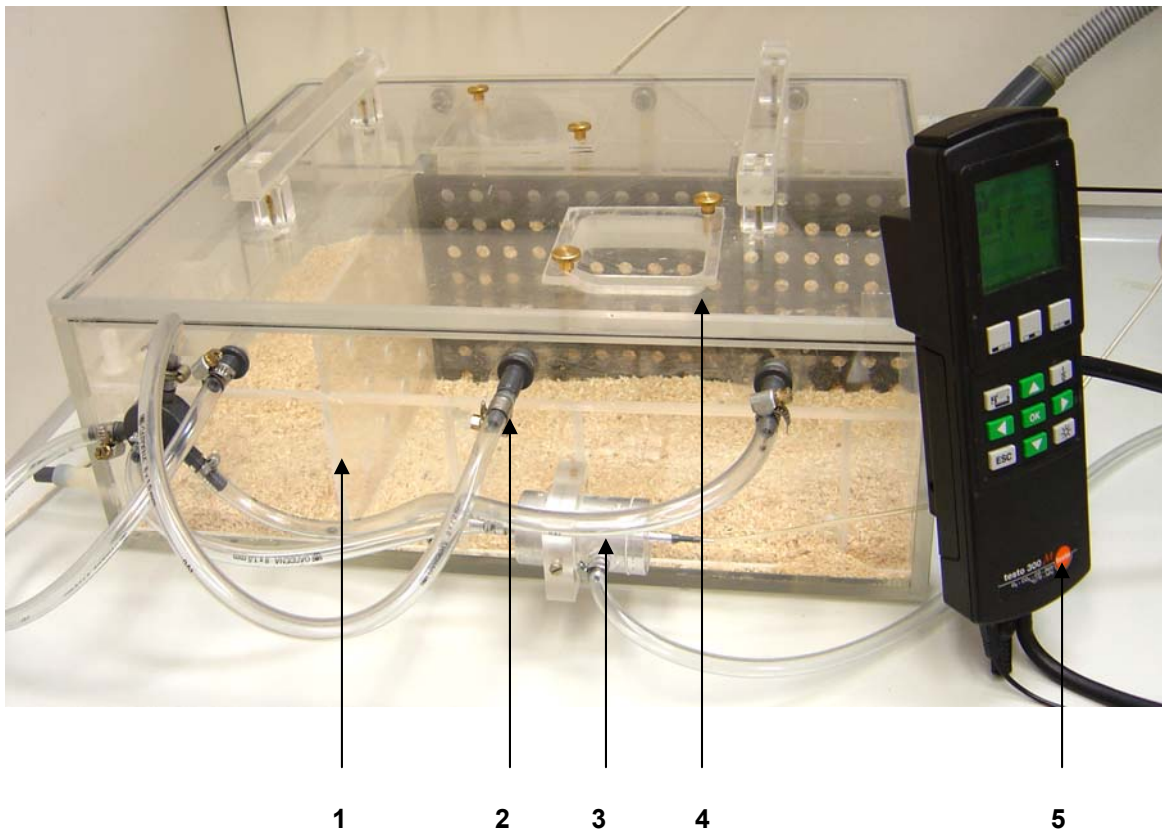


Abb. 14: Hypoxiekasten für Versuche in funktioneller Hypoxie. Die Tiere sind durch gefenstertere Trennwände in Gruppen zu je zwei Tieren geteilt. Das CO-Luft-Gemisch wird durch hochgelegene Gaseinlässe in den Kasten geleitet und durch tiefgelegene Auslässe abgeleitet.

1=Trennwand mit Bohrungen, 2=Gaseinlass (insges. 3 Gaseinlässe), 3=Mischdüse, 4=Einlass für Ratten, 5=CO-Messgerät

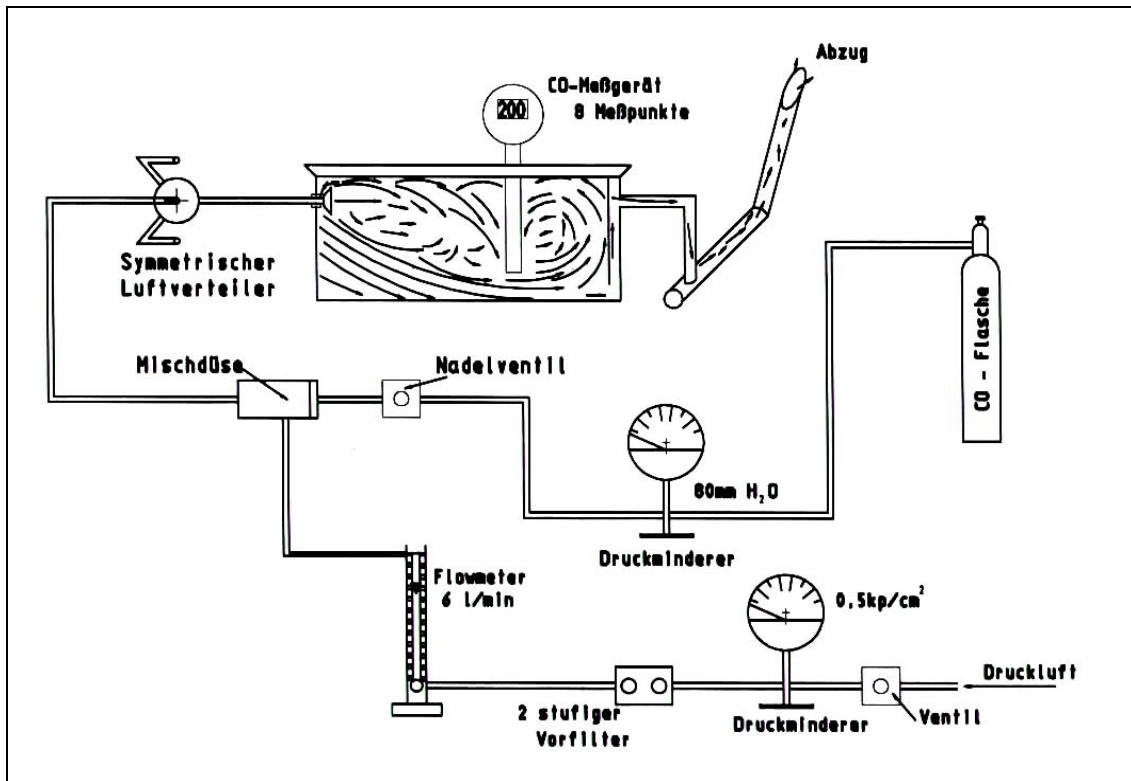


Abb. 15: Schematische Zeichnung des Hypoxiekastens und der zugehörigen Gasleitungen.

Die Versuche an wachen Ratten in funktioneller Hypoxie wurden in einem Hypoxiekasten durchgeführt. Der Hypoxiekasten wurde während des Versuchs mit einem Gasgemisch, bestehend aus Atemluft und unterschiedlichen Konzentrationen Kohlenmonoxid (0,00-0,14 Vol %), durchströmt. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen den typischen Versuchsaufbau für eine 4-stündige CO-Exposition. Während der CO-Exposition wurde die CO-Konzentration im Hypoxiekasten anhand eines Messgerätes (Rauchgasmessgerät testo 300 M, Testo GmbH & Co, Lenzkirch) in 15-minütigem Zeitabstand kontrolliert und aufgezeichnet (Tischdrucker, Testo GmbH & Co, Lenzkirch). Abbildung 16 verdeutlicht Details in einer Konstruktionszeichnung. Die Zeichnung gibt den Kasten in drei Hauptansichten wieder sowie Detaildarstellungen einiger wichtiger Ventile.

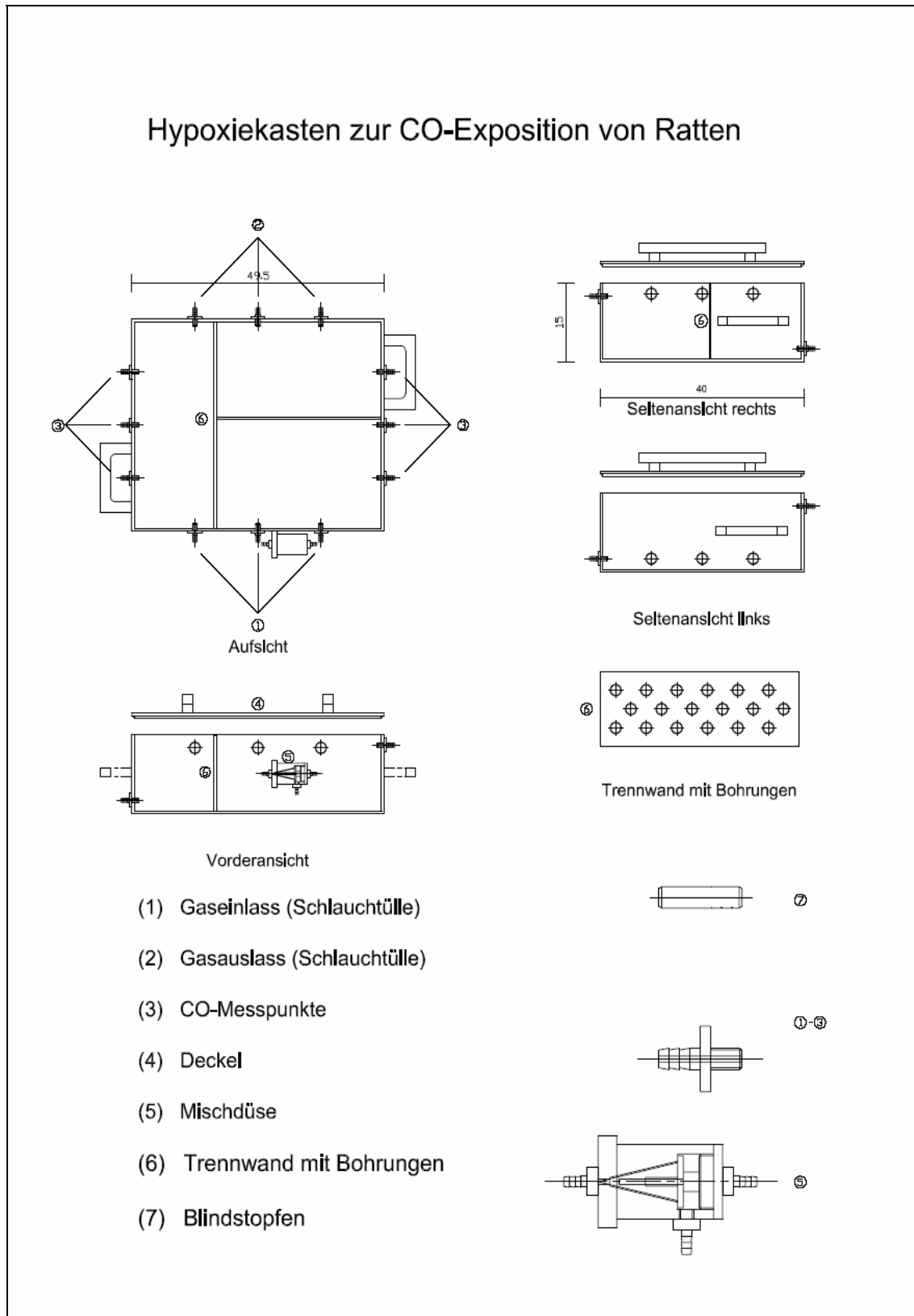


Abb. 16: Konstruktionszeichnung des Hypoxiekastens und Detaildarstellung der wichtigsten Ventile

2.4 Messmethodik

Bei den Versuchen wurden folgende Parameter bestimmt, wobei Punkt 4 und 5 vor bzw. während des Versuchs, die anderen Parameter später bestimmt wurden:

- 1) EPO-Serumkonzentration (mU/ml)
- 2) Plasminogenaktivität (ng ANG)
- 3) EPO-mRNA
- 4) MAP (diastol.RR+(systol.RR-diastol.RR)/3)
- 5) Renaler Blutfluss (ml/min), nur bei stenosierten Tieren
- 6) Katecholamingehalt der Nieren (ng/ml)

2.4.1 Elektromagnetische Blutflussmessung

Das Prinzip der elektromagnetischen Blutflussmessung beruht auf einer Spannungsänderung in einem magnetischen Feld, sobald geladene Teilchen durch dieses Feld fließen.

Der Messkopf, der um das Gefäß gelegt wird, enthält eine Spule, an die eine Spannung angelegt wird. Die Bewegung geladener Teilchen, in diesem Fall Ionen (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , H^+) des intravasalen Blutvolumens, induziert eine Spannungsänderung, die proportional zur Flussgeschwindigkeit ist. Durch die Wahl eines entsprechenden Blutflussmesskopfes (Innendurchmesser des Flowkopfes, der das Gefäß umschließt, bei der Nierenarterie von Sprague-Dawley Ratten: 1,2 bis 1.4 mm) ist die Querschnittsfläche des Blutgefäßes festgelegt. Die Flussmenge (ml/min) kann so in Abhängigkeit von der Zeit und der proportional zur Ionenkonzentration ansteigenden Spannungsänderung im Magnetfeld gemessen werden.

Da die Spannungsänderung im Magnetfeld von der Ladungsmenge der durchfließenden Teilchen abhängig ist, erzeugen Erythrozyten keine Spannungsänderung. Die Blutflussmessung ist daher vom Hämatokrit des Blutes abhängig.

Bei jedem Experiment wurde der Nullfluss des RBF durch Abklemmen der Nierenarterie bestimmt. Die Messgenauigkeit wird vom Hersteller auf 5% angegeben.

2.4.2 Plasmareninbestimmung

Das Blut wurde zu 200µl der folgenden vorgekühlten Lösung zugegeben: Hepes-Tris- Puffer + 2 mg/ml Na₂EDTA (pH 7,4). Anschließend wurde bei 10 000 U/min (Hettich Zentrifugen Mikro 12–24, Tuttlingen) 1 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Eppendorf-Gefäß (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt und bis zur weiteren Analyse bei –80°C eingefroren. Die Reninaktivität wurde mit einem spezifischen Radioimmunoassay bestimmt, der auf der Fähigkeit des Renins zur Angiotensin I - Bildung beruht. Als Reninsubstrat wurde Angiotensinogen aus Plasma von bilateral nephrektomierten Ratten verwendet. Jede Probe wurde zu einer bestimmten Menge Ratten-Angiotensinogen gegeben und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann im Eisbad gestoppt.

Danach wurde ¹²⁵I- Angiotensin I und Angiotensin I - Antikörper pipettiert und bei 4 °C 18 h äquilibriert. Die Trennung des gebundenen von freien Angiotensin I erfolgte mit Aktivkohlesuspension, die mit Gamma-Globulin (Cohn Faktor I-IV, vom Rind, Sigma) beschichtet war. Die Proben wurden 10 min gut geschüttelt, bei 2800 rpm zentrifugiert und der Überstand im Gamma-Zähler (Cobra Auto-Gamma R, Groningen, Niederlande) gemessen.

2.4.3 Reversed Phase HPLC

Die HPLC (high pressure liquid chromatography) diente der quantitativen Katecholaminbestimmung in der Niere von denervierten Ratten. Die Tiere galten als hinreichend denerviert, wenn der Katecholamingehalt der beiden Nieren jeweils unter 15 % des Ausgangswertes lag.

Probenvorbereitung: Die bei –80°C eingefrorenen Proben wurden am Tag der Messung aufgetaut und in mit 2 ml eisgekühlter Sulfosalicylsäure gefüllte

Reagenzgläser gegeben. Mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T 25, Janke & Kunkel, Staufen im Br.) wurden die Proben homogenisiert. Dem Homogenat wurde der interne Standard DHBA (Dihydroxy-benzylamin) in einer Konzentration von 100 ng/g Nierengewicht zugegeben. Die Proben wurden für 1 h auf Eis gekühlt gelagert. Danach wurde die Lösung gemischt, zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und dem Überstand 1 ml Tris-Puffer zugegeben. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (Heidolph MR 80) bestimmt und mit Hilfe von 2 M NaOH Lösung auf pH 8,6 eingestellt. Dann wurden 70 mg Aluminiumoxid (Al_2O_3) zugegeben, an das die Katecholamine adsorbiert werden.

Die Proben wurden für 10 bis 15 min in einem Rotationsmischer (Rotationsmischer 3300, Eppendorf, Hamburg) geschüttelt, anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Aluminiumoxid wurde dann mit Hilfe von zweimal je 500 ml Aqua bidest. in Filtrationssäulen überführt. Hierauf wurde das Gemisch im Schüttler durchmischt und in der Zentrifuge (Hettich Rotanta, Hettich, Tuttlingen) für 10 min bei ca. 3000 U/min zentrifugiert.

Nach diesem zweiten Waschschrift blieb nur das Al_2O_3 mit den daran gebundenen Katecholaminen zurück. Die Katecholamine wurden vom Aluminiumoxid durch Zugabe von 300 μl Phosphorsäure (H_3PO_4) eluiert. Die jetzt in der flüssigen Phase vorliegenden Katecholamine wurden durch erneute Zentrifugation bei 2400U/min in spezielle HPLC-Vials überführt. Die Proben konnten ohne Verluste bis zu einem Tag im Kühlschrank aufbewahrt werden, bevor sie mit der HPLC analysiert wurden [259].

2.4.4 Bestimmung von Erythropoetin im Enzymimmunoassay (ELISA)

Die Bestimmung der EPO-Serumkonzentration wurde mit dem kommerziellen Enzymimmunoassay der Firma medac (medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Wedel) durchgeführt.

Prinzip: Im EPO-ELISA wurden zwei monoklonale Antikörper (aus Mäusen) zur Bestimmung der EPO-Serumkonzentration (mU/ml) eingesetzt. Ein Antikörper

ist auf der Mikrotiterplatte fixiert und bindet im ersten Reaktionsschritt das im Serum vorliegende EPO. Im zweiten Reaktionsschritt wird ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper zugegeben und bindet an den bereits vorhandenen EPO–Antikörper–Komplex. Die Phosphataseaktivität des gebundenen Konjugats modifiziert das Substrat p–Nitrophenylphosphat zu einer intensiv gelb gefärbten p-Nitrophenol-Lösung. Die Extinktion wird bei 405 nm bestimmt und folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz: $E = {}^{10}\log I_0/I = \epsilon \times c \times d$
Die EPO-Aktivität im Serum wird in mU/ml angegeben.

2.4.5 Bestimmung von Erythropoetin-mRNA

2.4.5.1 Gesamt-RNA Isolierung aus Leber- und Nierengewebe mittels RNA-pure System

Zur Isolierung der Gesamt-RNA, Amplifikation und Sequenzierung wurde durch übliche Vorsichtsmaßnahmen (Handschuhe, Verwendung von Wasser für Injektionszwecke, usw.) darauf geachtet, Kontaminationen jeglicher Art zu vermeiden. Die Gewebeproben wurden gewogen und anschließend daraus die Gesamt-RNA isoliert, wobei 100 mg Gewebe mit 1 ml peqGold RNA-Pure (PeqLab, Erlangen) versetzt und im Potter homogenisiert wurden. Das Homogenat wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200 µl Chloroform zu 1 ml Homogenat hinzugegeben. Durch kräftiges Schütteln wurden die Phasen durchmischt und für 5 Minuten bei 12 000×g* (4°C) zentrifugiert. Die obere RNA-haltige, flüssige Phase wurde abpipettiert und vorsichtig in ein neues Eppendorf überführt. Zur Fällung der RNA wurde pro ml Überstand 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine zehnmütige Zentrifugation bei 12000×g* (4°C). Der Überstand wurde dekantiert und das entstandene Pellet mit je 1 ml 75 % Alkohol durch Schütteln und anschließendes Zentrifugieren (10 Minuten; 12000×g*; 4°C) zweimal gewaschen. Die hieraus gewonnene RNA wurde in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen und im Wasserbad bei 60°C für 10 Minuten erhitzt. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -80°C.

2.4.5.2 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl RNA-Lösung in 79 µl Aqua destilata pipettiert und die optische Dichte der Lösung bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration RNA [mg/ml]} = \text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times 0,04 \text{ mg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.4.5.3 Multiplex RT-PCR

Der Ausdruck Multiplex steht für die Anwendung mehrerer Primerpaare in einem Probenansatz während einer PCR. Es werden daher mehrere cDNA-Sequenzen gleichzeitig amplifiziert. Der Ausdruck Duplex/Triplex usw. steht dabei für die Anzahl der benutzten Primerpaare. Bei der Quantifizierung mittels Duplex RT-PCR wird im Allgemeinen mit der zu untersuchenden Ziel-mRNA ein sogenannter interner Standard mitgeführt. Die Menge der amplifizierten Ziel-DNA wird dann zur Menge des internen Standards in Relation gesetzt. Als interner Standard kann ein so genanntes „housekeeping gene“ eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür Cyclophyllin verwendet. Die Sequenz des „housekeeping gene“ wird mit der Zielsequenz koamplifiziert. Eine Voraussetzung für den Gebrauch des endogenen „housekeeping gene“ ist natürlich die Nichtbeeinflussung der Expressionsrate durch die Versuchsbedingungen.

2.4.5.4 Reverse Transkription

Mittels der reversen Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Reaktion wurden Random-Primer eingesetzt, die je nach Sequenz an die mRNA hybridisieren, so dass alle mRNA-Bereiche in der cDNA vorhanden waren. Alle Pipettierschritte wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt.

Die für die Reaktion benötigte Menge an Gesamt-RNA betrug 0,5 µg. Pro Eppendorfgefäß wurde 5 mM MgCl₂, 0,5 U RNase Inhibitor RNAsin (Promega, Mannheim), 0,25 µg Oligo-dT₁₅-Primer und 0,25 µg Random (N)₆-Primer

hinzupipettiert. Durch Zentrifugation wurde der Gesamtinhalt gesammelt, der RT-Mix (1× GeneAmp PCR Buffer II, Applied Biosystems, Darmstadt) und 1 mM dNTP (deoxynucleotide triphosphate) hinzugegeben und anschließend auf ein Volumen von 20 µl eingestellt. Die Komponenten wurden durch vorsichtiges Auf- und Abziehen der Pipette durchmischt. 12.5 U der AMV-RT-DNA (Avian Myeloblastosis Reverse Transkriptase, PeqLab, Erlangen) wurden pro Eppendorf hinzugegeben und ebenfalls durch leichtes Auf- und Abziehen der Pipette durchmischt. Nun wurden die Proben im Wasserbad bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten wurde die Reverse Transkriptase denaturiert, wodurch die Reaktion stoppte.

2.4.5.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (Quantitative real-time RT-PCR)

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Erythropoetin- und Cyclophilin-A- (Peptidyl-Prolyl-Isomerase A, PPIA) Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, München bezogen. Cyclophilin A diente bei der Quantifizierung als interner Standard. Die Expressionsrate des Zielgenes Erythropoetin wurde mit Hilfe des PCR-Analysierungsprogramms berechnet. Alle Ergebnisse sind als Quotient von EPO-mRNA-Kopien zu 1000 Cyclophilin-A-Kopien angegeben. Die PCR-Primer hatten eine Länge von 18-20 Basen und besaßen einen Anteil von 60-70% Cytosin und Guanidin (C und G). Folgende Primerpaare wurden für die PCR verwendet:

Primerpaar	S/AS	Sequenz	Basenlänge
Erythropoetin	Sense	5'-CACGAAGCCATGAAGACAGA-3'	20
Erythropoetin	Antisense	5'-GGCTGTTGCCAGTGGTATTT-3'	20
Cyclophilin-A	Sense	5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3'	20
Cyclophilin-A	Antisense	5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC-3'	19

Alle Substanzen waren vorgekühlt und wurden auf Eis pipettiert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Als Ausgangstemplatemenge wurden je 50 ng cDNA-Lösung vorgelegt. Diese

wurde mit einem entsprechenden Reaktionsmix (FastSart DNA Master SYBR Green I kit, Roche, Mannheim) versetzt. Pro Ansatz wurden 3 mM MgCl₂ und jeweils 0,5 µl sense/antisense Primer hinzupipettiert. Die Komponenten wurden vorsichtig gemischt und anschließend zentrifugiert. Nun folgte die Amplifikation im PCR-Cycler nach folgendem Protokoll:

Zielsequenz	Vorinkubation	Denaturierung	Annealing	Elongation	Letzte Elongation	Zyklenzahl
EPO	94°C	95°C 10 min	95°C 10 s	68°C 10 s	72°C 16 s	45
PPIA	94°C	95°C 10 min	68-58°C 10 s	72°C 16 s		45

2.5 Verwendete Materialien und Reagenzien

2.5.1 Testsubstanzen

Propranolol (-Hydrochlorid)

Wirkung: β₁-und β₂-Rezeptoren blockierende Substanz

Applikation: intraperitoneal

Summenformel: C₁₈H₂₁NO₂(HCl)

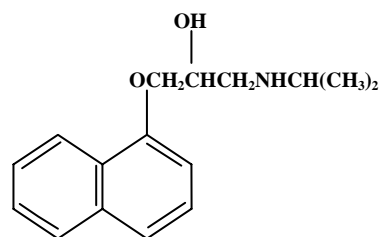
Mol. Gewicht: 295,8

Dosierung: 4 mg/kg KG

Lösungsmittel: 0,85% NaCl

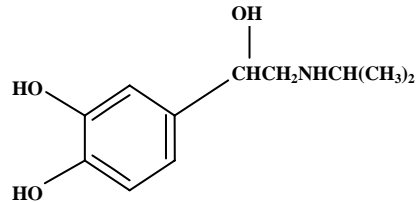
Präparation: fest, weiß

Bezug: Sigma



Isoproterenol

Wirkung:	β_1 - und β_2 -Rezeptoren stimulierende Substanz
Applikation:	intravenös (Alzet [®] -Pumpe)
Summenformel:	$C_{11}H_{17}NO_3$
Mol. Gewicht:	556,6
Dosierung:	3 μ g/h/kg
Lösungsmittel:	0,85% NaCl
Bezug:	Sigma



[Pro34]-substituiertes Peptid YY (PYY)

Wirkung:	Neurotransmitter
Applikation:	intravenös (Alzet [®] -Pumpe)
Primärstruktur:	Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH ₂
Dosierung:	0,3 μ g/min/kg
Lösungsmittel:	0,85 % NaCl
Bezug:	Sigma

Neuropeptid Y-Rezeptorantagonist

Wirkung:	spezifischer Antagonist am Neuropeptid Y ₁ - und Y ₅ -Rezeptor
Applikation:	intravenös (Alzet [®] -Pumpe)
Primärstruktur:	Ile-Glu-Pro-Dapa-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
Dosierung:	0,5 μ g/min/kg
Lösungsmittel:	0,85 % NaCl
Bezug:	Sigma

2.6 Statistische Auswertung

Alle Daten werden in Form von Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) präsentiert. Als signifikant wurde in allen Versuchen ein $p < 0,05$ betrachtet. Für die Gruppenvergleiche wurden die Mittelwerte der Versuchsgruppe gegen die jeweilige Kontrollgruppe mittels ungepaartem t-test und Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiede geprüft. Hierfür wurde das Statistikprogramm JMP[®] 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Teil I: Einfluss des autonomen Nervensystems auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

3.1.1 Kontrollgruppen

Eine mögliche Auswirkung des experimentellen Stresses durch Narkose und chirurgische Präparation auf die EPO-Sekretion wurde anhand von scheinoperierten Tieren (**SH**) untersucht. Nach hypoxischem Stimulus (0,00 bis 0,12 Vol % CO) unterschied sich die EPO-Serumkonzentration der scheinoperierten Tiere (**SH**) nicht signifikant von der EPO-Sekretion un behandelter Tiere (**INN**) (Abb. 17, Tab. 1). Dies zeigte sich auch anhand der EPO-mRNA-Expression in den Nieren (Abb. 18). Der EC_{50} -Wert lag bei scheinoperierten Tieren (**SH**) etwas niedriger als bei der **INN**-Gruppe (Abb. 17).

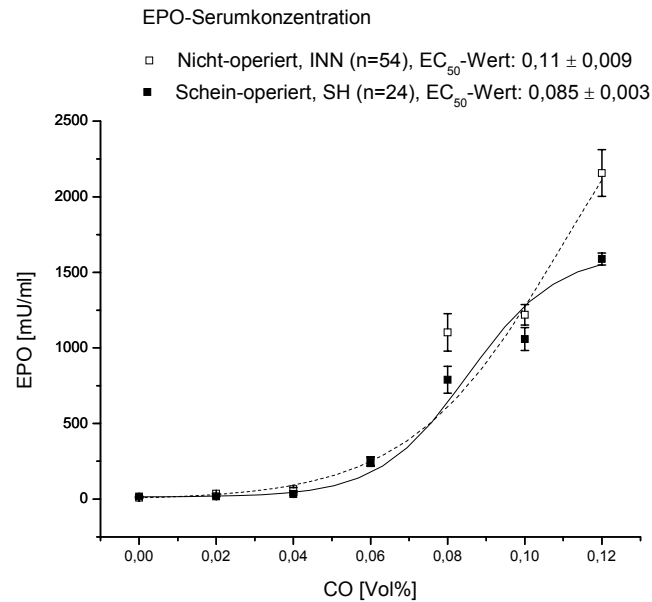


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurve der EPO-Spiegel in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00 bis 0,12 Vol % CO über 4 Stunden), scheinoperierte Ratten (SH) vs. Kontrollratten (INN), EC_{50} -Werte

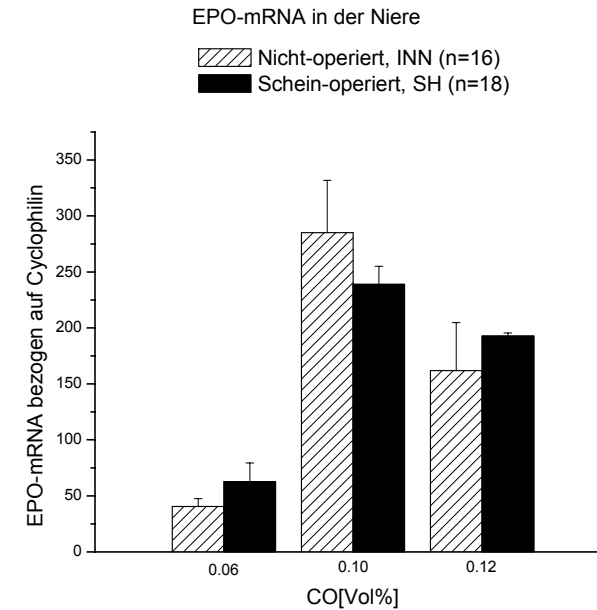


Abb. 18: EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, bezogen auf Cyclophilin in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,06, 0,10 und 0,12 Vol % CO über 4 Stunden); scheinoperierte Ratten (SH) vs. Kontrollratten (INN)

Tab. 1: EPO-Serumkonzentrationen und EPO-mRNA Gehalt in der Niere bei scheinoperierten Ratten (SH) vs. Kontrollratten (INN) in Abhängigkeit von der CO-Konzentration, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM

CO (Vol %)	Nicht operierte Kontrolltiere (INN)				Scheinoperierte Kontrolltiere (SH)			
	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n
0,00	8,1 \pm 0,2	5			17,8 \pm 2,3	2		
0,02	35,4 \pm 2,8	4			17,5 \pm 3,5	2		
0,04	65,8 \pm 10,1	5			33,5 \pm 6,5	2		
0,06	250,5 \pm 27,3	9	40,6 \pm 6,9	5	249,2 \pm 31,8	6	62,6 \pm 16,9	11
0,08	1103 \pm 123,3	8			789 \pm 88,8	3		
0,10	1218,8 \pm 67,3	10	285,1 \pm 46,7	7	1058,8 \pm 75,1	5	238,8 \pm 16,2	5
0,12	2157 \pm 154,8	13	161,9 \pm 42,8	4	1588 \pm 40	4	192,8 \pm 2,7	2
Gewicht (g)	302,1 \pm 3,5				293,4 \pm 3,2			
n	54		16		24		18	

3.1.2 Dosiswirkungskurve nach beidseitiger Denervierung der Nierenarterien

Die Dosiswirkungskurve nach bilateraler Denervierung der Nierenarterie (**DNX**) zeigte eine Linksverschiebung mit signifikant höheren EPO-Serumkonzentrationen nach Exposition von 0,06 Vol % CO ($p < 0,05$) verglichen mit innervierten Kontrolltieren (**INN**, Abb. 19 und Tab. 2). Der EC_{50} -Wert lag bei denervierten Tieren niedriger als bei der Kontrollgruppe (Abb. 19). Bei höheren (0,08-0,12 Vol %) und niedrigeren (0,00-0,04 Vol %) CO-Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied in der EPO-Produktion festgestellt werden (Abb. 19 und Tab. 2). Die renale EPOmRNA war nach Exposition von 0,06 Vol % CO signifikant höher im Vergleich zu innervierten Kontrolltieren (**INN**, $p < 0,05$, Abb. 20 und Tab. 2). Ratten nach renaler Denervierung überlebten eine CO-Exposition nicht, wenn diese 0,12 Vol % überschritt. Die PRA der denervierten Tiere (**DNX**) unterschied sich nicht signifikant von der PRA der Kontrollgruppe (**INN**). Der Noradrenalin-Gehalt in den denervierten Nieren war $< 15\%$ verglichen mit den innervierten Nieren der Kontrolltiere (Tab. 2).

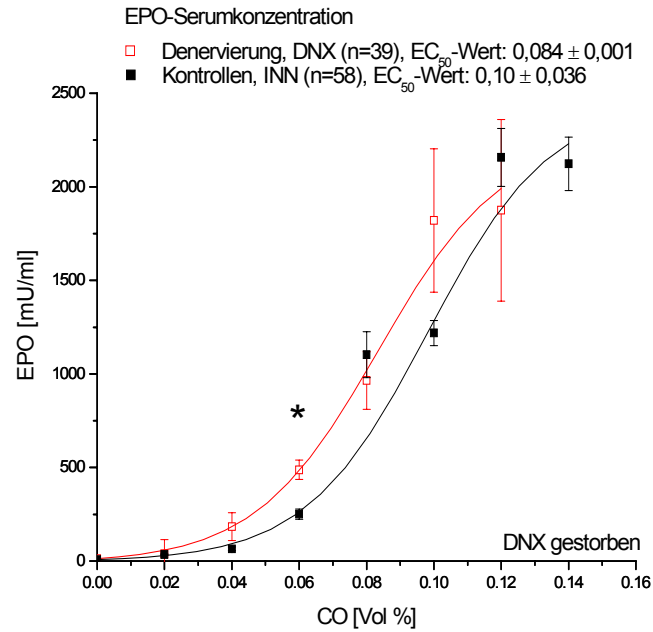


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurve der EPO-Spiegel in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00 bis 0,14 Vol % CO über 4 Stunden), denervierte Ratten (DNX) vs. Kontrollratten (INN), EC_{50} -Werte, * = $p < 0,05$ vs. INN

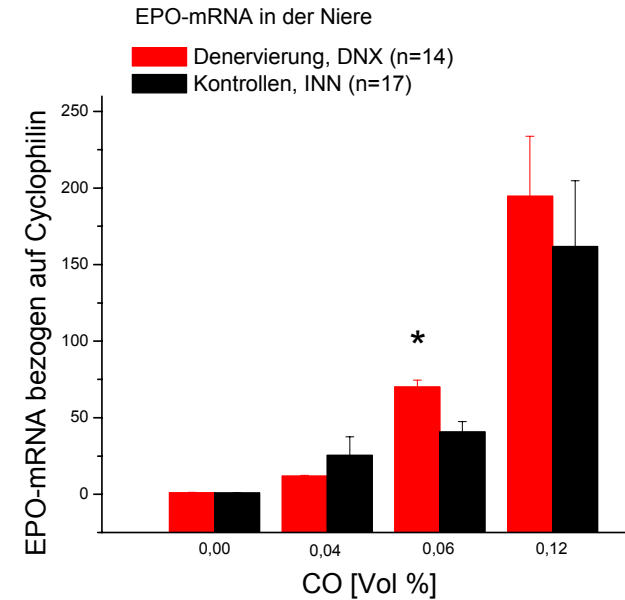


Abb. 20: EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, bezogen auf Cyclophilin in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00, 0,04, 0,06 und 0,12 Vol % CO über 4 Stunden); denervierte Ratten (DNX) vs. Kontrollratten (INN), * = $p < 0,05$ vs. INN

Tab. 2: EPO-Serumkonzentrationen, EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, Gewicht und Noradrenalin-Gehalt des Nierengewebes bei denervierten Ratten (DNX) vs. Kontrollratten (INN) in Abhängigkeit von der CO-Konzentration, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, *= $p < 0,05$ vs. INN

CO (Vol %)	Kontrollgruppe (INN)				Bilaterale Denervierung (DNX)			
	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n
0,00	8,1 \pm 0,2	5	0,9 \pm 0,1	6	12,7 \pm 1,6	3	1,0 \pm 0,3	2
0,02	35,4 \pm 2,8	4			39,4 \pm 7,5	6		
0,04	65,8 \pm 10,1	5	25,4 \pm 12,2	2	184,6 \pm 74,3	6	11,9 \pm 0,4	2
0,06	250,5 \pm 27,3	9	40,6 \pm 6,9	5	487,8 \pm 51,6*	8	70,1 \pm 4,4*	3
0,08	1103,0 \pm 123,3	8			965,4 \pm 153,3	6		
0,10	1218,8 \pm 67,3	10			1820,6 \pm 382,9	6		
0,12	2157 \pm 154,8	13	161,9 \pm 42,8	4	1875 \pm 485,4	4	194,6 \pm 39,2	7
0,14	2123,3 \pm 142,8	4						
Gewicht (g)	311,5 \pm 6,4				301,3 \pm 5,2			
Noradrenalin/Niere (ng/ml)	201,6 \pm 21,0				19,8 \pm 1,8*			
n	58		17		39		14	

3.1.3 Einfluss von Isoproterenol, Neuropeptid Y, Propranolol und Neuropeptid Y-Antagonist auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

Um zu prüfen, ob ein nervaler Transmitter die signifikant höheren EPO-Serumkonzentrationen bei denervierten Tieren nach Exposition von 0,06 Vol % CO vermittelt, wurde denervierten Tieren Neuropeptid Y (0,3 µg/min/kg, **N-DNX**), Isoprenalin (3 µg/h/kg, **I-DNX**) oder 0,85 % NaCl (1,0 µl/h) als Vehikel (**V-DNX**) verabreicht. Die scheinoperierten Tiere (INN) mit intakter renaler Innervation erhielten Neuropeptid Y-Antagonist (0,5 µg/min/kg, **NA-INN**), Propranolol (4 mg, **P-INN**) oder 0,85 % NaCl (1,0 µl/h) als Vehikel (**V-INN**).

Die Gabe von Neuropeptid Y führte bei denervierten Tieren (N-DNX) zu signifikant niedrigeren EPO-Serumkonzentrationen ($p < 0,05$), während die Gabe von Isoprenalin nur eine geringe Reduktion der EPO-Serumkonzentration nach Exposition von 0,06 Vol % CO im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (V-DNX) bewirkte (Abb. 21 und Tab. 3). Dieses Ergebnis zeigte sich auch anhand der EPO-mRNA in der Niere (Abb. 22). Nach Gabe von einem Neuropeptid Y Antagonisten (NA-INN) und nach Gabe von Propranolol (P-INN) wurden die EPO-Serumkonzentrationen scheinoperierter Tiere im Vergleich zu den Kontrollen (V-INN) nur leicht erhöht nach Exposition von 0,06 Vol % CO (Abb. 21 und Tab.3). Auch die EPO-mRNA-Menge in den Nieren war nicht verschieden nach Applikation der beiden Testsubstanzen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (Abb. 22 und Tab. 3). Der Noradrenalin-Gehalt im Nierengewebe lag bei allen denervierten Tieren unter 15 % vs. den Kontrolltieren (INN) (Tab. 3).

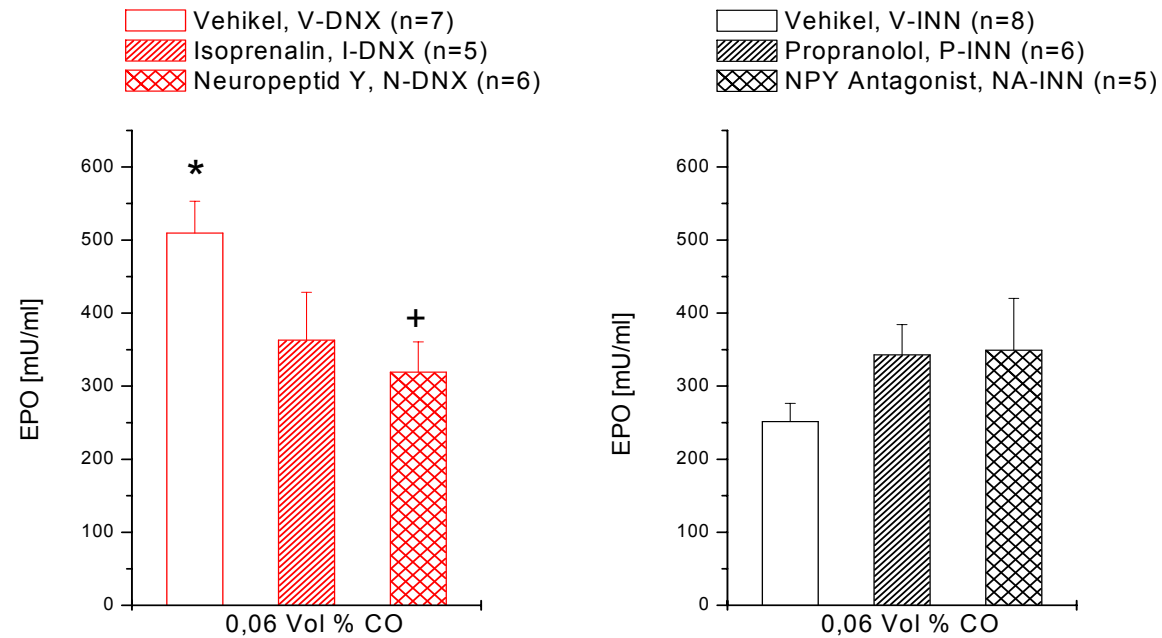


Abb. 21: EPO-Serumkonzentrationen im Vergleich; denervierte Tiere unter Gabe von Isoproterenol (I-DNX), Neuropeptid Y (N-DNX) oder 0,85 %NaCl (V-DNX) und scheinoperierte Tiere unter Gabe von Propranolol (P-INN), Neuropeptid Y-Antagonist (NA-INN) oder 0,85 % NaCl (V-INN), CO-Exposition bei 0,06 Vol % über 4 Stunden, *=p<0,05 vs. V-INN, +=p<0,05 vs. V-DNX

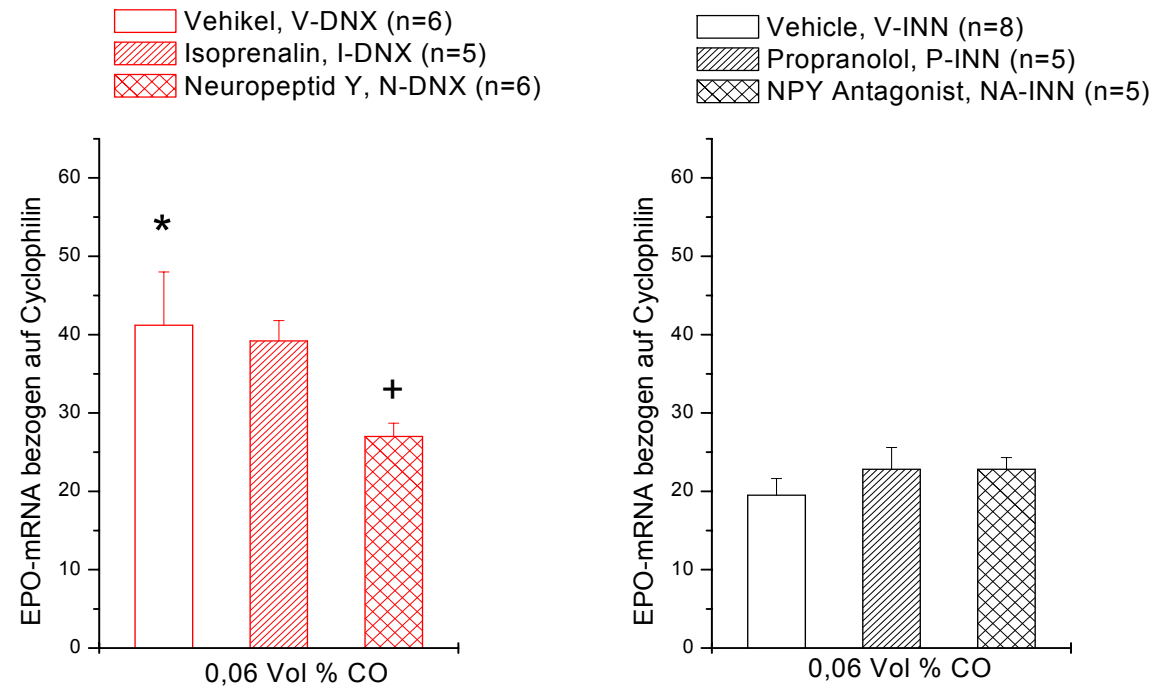


Abb. 22: EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, bezogen auf Cyclophilin; denervierte Tiere unter Gabe von Isoproterenol (I-DNX), Neuropeptid Y (N-DNX) oder 0,85 %NaCl (V-DNX) und scheinoperierte Tiere unter Gabe von Propranolol (P-INN), Neuropeptid Y-Antagonist (NA-INN) oder 0,85 % NaCl (V-INN), CO-Exposition bei 0,06 Vol % über 4 Stunden, $*=p<0,05$ vs. V-INN

Tab. 3: EPO-Serumkonzentrationen, EPO-mRNA Gehalt der Nieren, Körpergewicht und renaler Noradrenalin-Gehalt bei denervierten Tieren nach Gabe von Isoproterenol (I-DNX), Neuropeptid Y (N-DNX) oder 0,85 %NaCl (V-DNX) sowie bei scheinoperierten Tieren (INN) nach Gabe von Propranolol (P-INN), Neuropeptid Y-Antagonist (NA-INN) oder 0,85 % NaCl (V-INN) nach Exposition von 0,06 Vol % CO, I-DNX und N-DNX vs. V-DNX, P-INN und NA-INN vs. V-INN. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. V-INN, ** $p < 0,05$ vs. V-DNX

Versuchsgruppen (0,06Vol % CO)	Gewicht (g)	EPO-Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n	Noradrenalin/Niere (ng/ml)
V-DNX	295 \pm 8	509,6 \pm 43,6*	7	43,1 \pm 6,0*	6	23,1 \pm 3,9
I-DNX	290 \pm 10	363 \pm 65,6	5	39,2 \pm 2,6	5	21,3 \pm 2,2
N-DNX	310 \pm 5,8	319,2 \pm 41,6**	6	27 \pm 1,7**	6	26,2 \pm 4,0
V-INN	297 \pm 16,5	251,5 \pm 24,9**	8	19,5 \pm 2,1**	8	-
P-INN	315 \pm 11,1	342,9 \pm 41,3	6	22,8 \pm 2,8	5	-
NA-INN	325 \pm 0	349,1 \pm 70,9	5	22,8 \pm 1,5	5	-

3.2 Teil II: Einfluss der Reduktion des Nierengewebes auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

3.2.1 Einseitige und subtotale Nephrektomie

Die Dosiswirkungskurven von einseitig nephrektomierten Ratten (**NX**), subtotal nephrektomierten Ratten (**NXX**) und der Kontrollgruppe (**INN**) zeigen bis 0,08 Vol % CO den gleichen Verlauf. Ab 0,08 Vol % CO verläuft die Dosiswirkungskurve der einseitig und der subtotal nephrektomierten Tiere horizontal, die Dosiswirkungskurve der Kontrollgruppe steigt dagegen weiter an. Die unter hohem hypoxischem Stimulus (0,10 und 0,12 Vol % CO) gemessene EPO-Serumkonzentration der NX-Gruppe ist um 56% bzw. um 66% (signifikant) niedriger als die Werte der Kontrollgruppe. Nach subtotaler (5/6) Nephrektomie (NXX) beträgt die bei maximalem Stimulus (0,10 und 0,12 Vol % CO) gemessene EPO-Serumkonzentration 36% bzw. 17% des EPO-Serumgehaltes der Kontrollgruppe und ist somit signifikant niedriger (Abb. 23 und Tab.4). Der EC_{50} -Wert liegt bei subtotal und einseitig nephrektomierten Tieren (NXX/NX) niedriger als bei der Kontrollgruppe (INN) (Abb. 23). Auch anhand der EPO-mRNA-Menge in der Restniere konnte sowohl bei einseitig als auch bei subtotal nephrektomierten Tieren unter hohem hypoxischem Stimulus (0,10 und 0,12 Vol % CO) ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gemessen werden (Abb. 24 und Tab. 4).

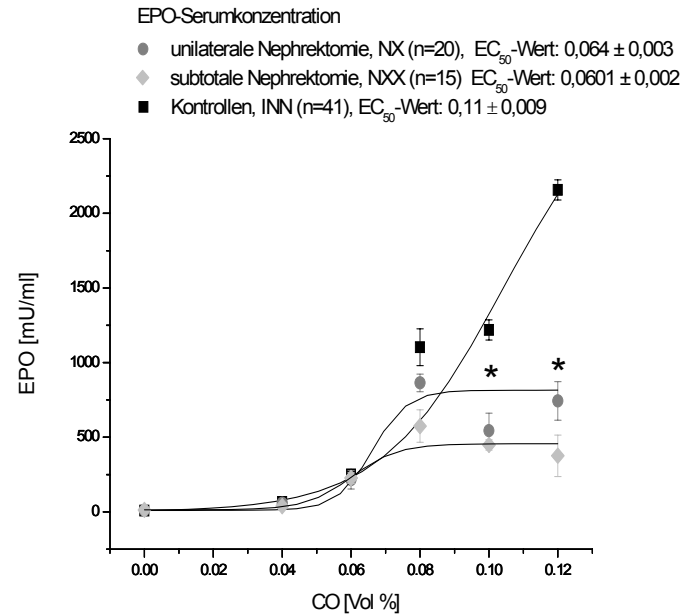


Abb. 23: Dosis-Wirkungskurve der EPO-Spiegel in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00 bis 0,12 Vol % CO über 4 Stunden), Ratten mit unilateraler Nephrektomie (NX) und 5/6-Nephrektomie (NXX) vs. Kontrollgruppe (INN), EC_{50} -Werte, *= $p < 0,05$ vs. INN

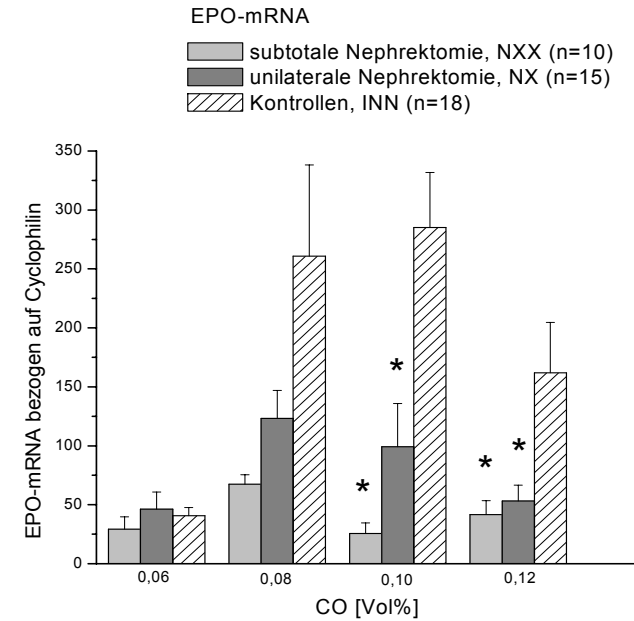


Abb. 24: EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, bezogen auf Cyclophilin in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00, 0,06 und 0,12 Vol % CO über 4 Stunden), einseitig nephrektomierte Ratten (NX) und subtotal (5/6) nephrektomierte Ratten (NXX) vs. Kontrollgruppe (INN) , *= $p < 0,05$ vs. INN

Tab. 4: EPO-Serumkonzentration, EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, Körpergewicht und PRA bei einseitig nephrektomierten Ratten (NX) und subtotal (5/6) nephrektomierten Ratten (NXX) vs. Kontrollgruppe (INN) in Abhängigkeit von der CO-Konzentration, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, *= $p < 0,05$ vs. INN

CO (Vol %)	Unilaterale Nephrektomie (NX)				Subtotale Nephrektomie (NXX)				Kontrolltiere (INN)			
	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n
0,00	9,9 \pm 0,9	2			12,5 \pm 8	2			8,1 \pm 0,2	5		
0,04	57,3 \pm 12,4	2			38,4 \pm 19,7	2			65,8 \pm 10,1	4		
0,06	215,0 \pm 61,2	4	46,23 \pm 14,64	4	226,6 \pm 35,9	4	29,3 \pm 10,4	2	250,5 \pm 27,3	5	40,6 \pm 6,9	5
0,08	863,8 \pm 59,1	4	123,2 \pm 23,7	2	574,5 \pm 108,9	2	67,4 \pm 8,1	2	1103 \pm 123,3	9	260,8 \pm 77,3	2
0,10	543,7 \pm 116,8*	3	99,14 \pm 36,7*	4	448,4 \pm 34,6*	2	25,6 \pm 9*	2	1218,8 \pm 67,3	9	285,1 \pm 46,7	7
0,12	743,3 \pm 129,5*	5	53,1 \pm 13,6*	5	375,7 \pm 138,9*	3	41,6 \pm 11,8*	4	2157 \pm 154,8	9	161,9 \pm 42,8	4
n	20		15		15		10		41		18	

3.3 Teil III: Einfluss der renalen Durchblutung auf die CO-stimulierte EPO- Sekretion

3.3.1 Vorversuche und Prüfung des experimentellen Modells

3.3.1.1 Initiale Vasodilatation nach unilateraler Ureterligatur

In Vorversuchen an drei Ratten wurden nach rechtsseitiger Nephrektomie und vollständiger Ligatur des linken Ureters unter Normoxie der RBF mittels elektromagnetischer Blutflussmessung aufgezeichnet. Der MAP wurde kontinuierlich durch blutige Blutdruckmessung über die A. femoralis bestimmt. Der RBF erhöhte sich innerhalb der ersten 15 min nach Ureterligatur um 74% und verdoppelte sich innerhalb der ersten 60 min. Auf diesem Niveau blieb der RBF für mindestens 4 Stunden konstant. Es zeigte sich keine Veränderung des MAP. Abbildung 25 zeigt RBF und MAP in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Ureterligatur. Damit ist die experimentelle Bedingung einer stark erhöhten Durchblutung der Niere etabliert.

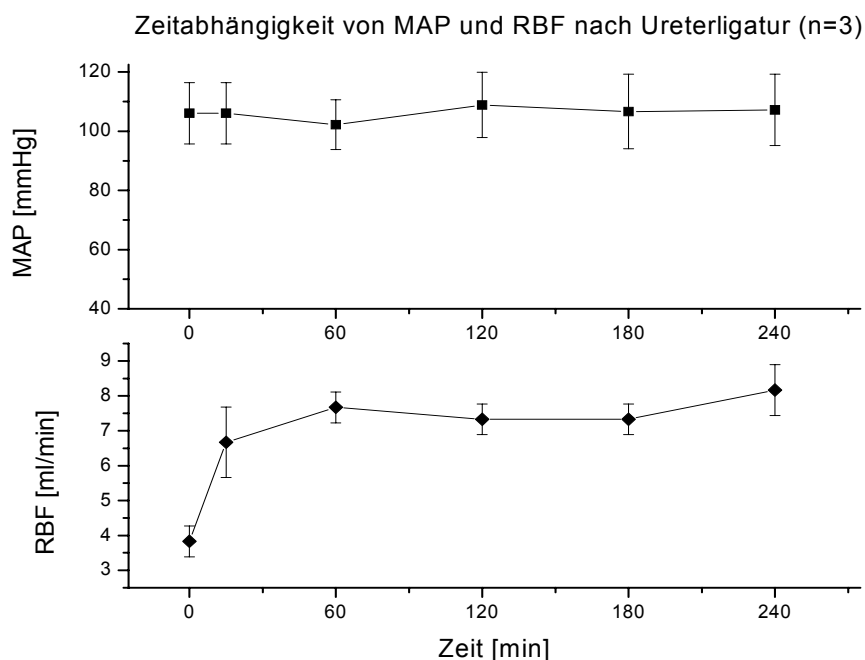


Abb. 25: Veränderung von MAP und RBF in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Ligatur des linken Ureters (0-240min)

3.3.2 Einfluss der akuten und chronischen Ureterligatur auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

Nach akuter Ligatur (30 min. vor CO-Exposition, **UL0,5**) des linken Ureters konnte nach 4-stündiger CO-Exposition bei 0,06 Vol % CO eine signifikante Erhöhung von EPO-Serumkonzentration und EPO-mRNA-Gehalt in der linken Niere im Vergleich zur Kontrollgruppe (einseitig nephrektomierte Ratten, **NX**) gemessen werden (Tab. 5, Abb. 26 und 27).

Nach chronischer Ligatur (24 Stunden vor CO-Exposition, **UL24**) des linken Ureters zeigte sich eine signifikante Verringerung der EPO-Serumkonzentration und des EPO-mRNA-Gehaltes der linken Niere im Vergleich zu Tieren mit akuter (30 min. vor CO-Exposition, **UL0,5**) Ligatur des linken Ureters und zur Kontrollgruppe (einseitig nephrektomiert, **NX**) (Tab. 5, Abb. 26 und Abb. 27).

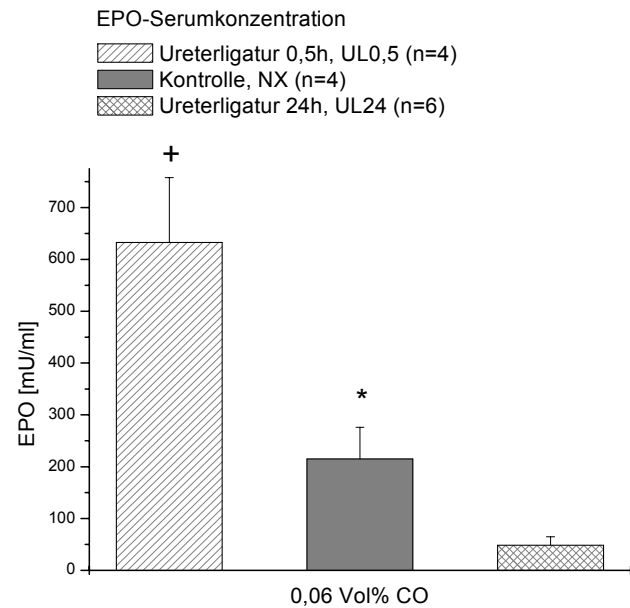


Abb. 26: EPO-Serumkonzentration im Vergleich; Ratten mit akuter Ureterligatur (UL0,5) vs. Ratten mit chronischer Ureterligatur (UL24), einseitig nephrektomierte Ratten (NX) als Kontrollgruppe, CO-Exposition bei 0,06 Vol % über 4 Stunden, *= $p < 0,05$ vs. UL24, += $p < 0,05$ vs. NX und UL24

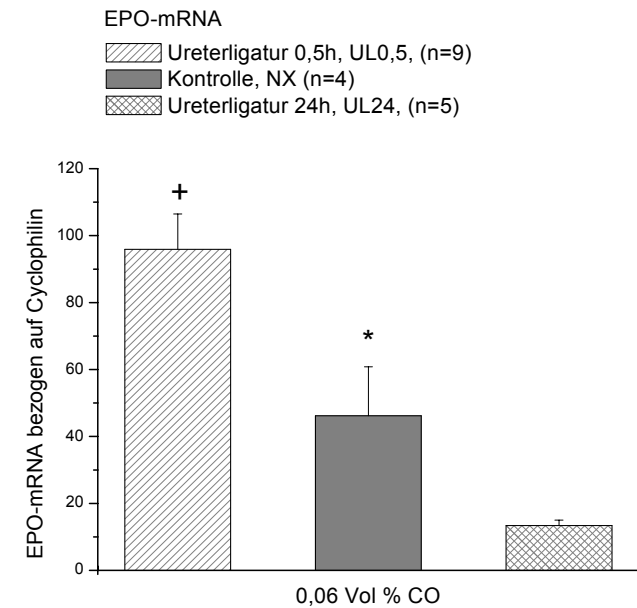


Abb. 27: EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, bezogen auf Cyclophilin im Vergleich; Ratten mit akuter Ureterligatur (UL0,5) vs. Ratten mit chronischer Ureterligatur (UL24), einseitig nephrektomierte Ratten (NX) als Kontrollgruppe, CO-Exposition bei 0,06 Vol % über 4 Stunden, *= $p < 0,05$ vs. UL24, += $p < 0,05$ vs. NX und UL24

Tab. 5: EPO-Serumkonzentrationen, EPO-mRNA-Gehalt in der Niere und Körpergewicht bei Ratten mit 30-minütiger (UL0,5) und 24-stündiger (UL24) Ureterligatur vs. einseitig nephrektomierte Ratten (NX) in Abhängigkeit von der CO-Konzentration, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, *= $p < 0,05$ vs. UL24, **= $p < 0,05$ vs. NX und UL24

Versuchsgruppen (0,06Vol % CO)	Gewicht (g)	EPO-Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n
einseitige Ureterligatur 0,5 h (UL0,5)	297,5 \pm 8,8	632,8 \pm 125,1**	4	95,9 \pm 10,6**	9
einseitige Nephrektomie (NX)	300 \pm 14	215 \pm 61,2*	4	46,2 \pm 14,6*	4
einseitige Ureterligatur 24 h (UL24)	295 \pm 12	48,5 \pm 16,6	6	13,4 \pm 1,6	5

3.3.3 Einfluss der Nierenarterienstenosierung auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

Um eine ca. 70%ige Stenosierung der Nierenarterie zu bewirken, wurde deren Lumen durch das Aufsetzen eines Metallclips verengt. Während der Präparation wurde der renale Blutfluss kontinuierlich mit einem elektromagnetischen Blutflussmessgerät aufgezeichnet. Abbildung 28 zeigt die Originalregistrierung des RBF vor, während und nach Stenosierung der Nierenarterie. Tab. 6 enthält den RBF vor und nach Stenosierung (n=12).

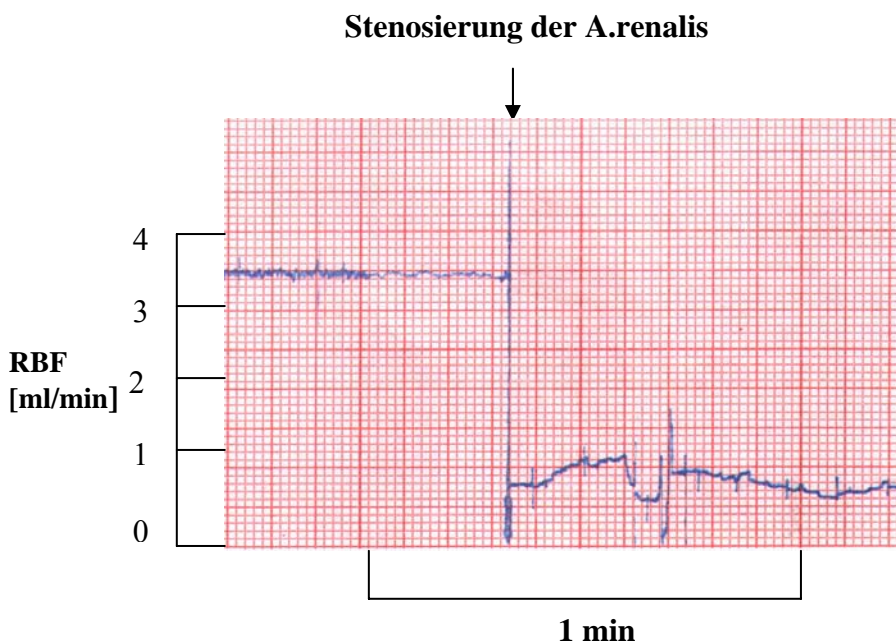


Abb. 28: Originalregistrierung des RBF (ml/min) vor und nach Stenosierung der linken Arteria renalis einer Ratte, Laufgeschwindigkeit 50mm/min.

Tab. 6: Vergleich des RBF vor und nach Stenosierung der A. renalis, dargestellt als Mittelwert \pm SEM, RBF-Reduktion absolut und prozentual

RBF _{vor Stenosierung} (ml/min)	4,4 \pm 0,3
RBF _{nach Stenosierung} (ml/min)	1,3 \pm 0,5
Δ RBF (ml/min)	3,1 \pm 0,8
Δ RBF (%)	71,1 \pm 6,8
n	12

Nach Stenosierung der linken Nierenarterie wurde unter verschiedenen hypoxischen Stimuli eine Erhöhung von EPO-Serumkonzentration und EPO-mRNA-Gehalt in der linken Niere gemessen werden, die jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe (einseitig nephrektomierte Ratten, **NX**) nicht signifikant war. (Tab. 7, Abb. 29 und 30). Die 4-stündige CO-Exposition erfolgte bei 0,00, 0,04 , 0,06, 0,08 und 0,12 Vol % CO.

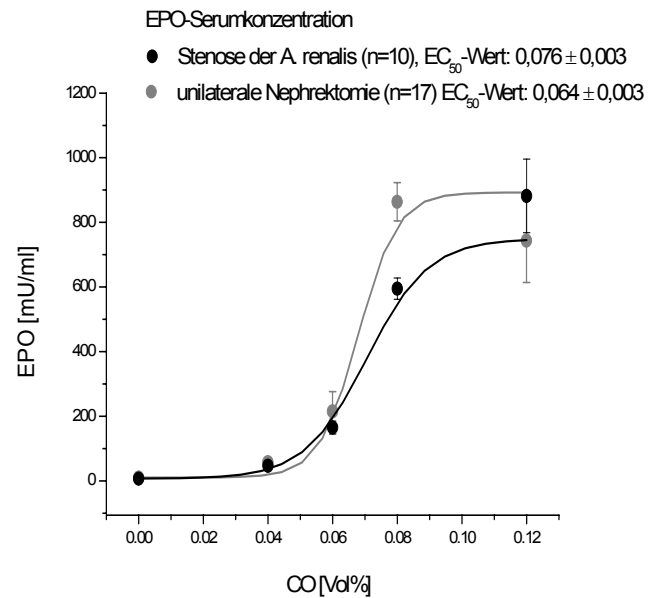


Abb. 29: Dosis-Wirkungskurve der EPO-Spiegel in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00 bis 0,12 Vol % CO über 4 Stunden), Ratten mit Stenosierung der A. renalis (ST) vs. einseitig nephrektomierte Ratten (NX), EC_{50} -Werte

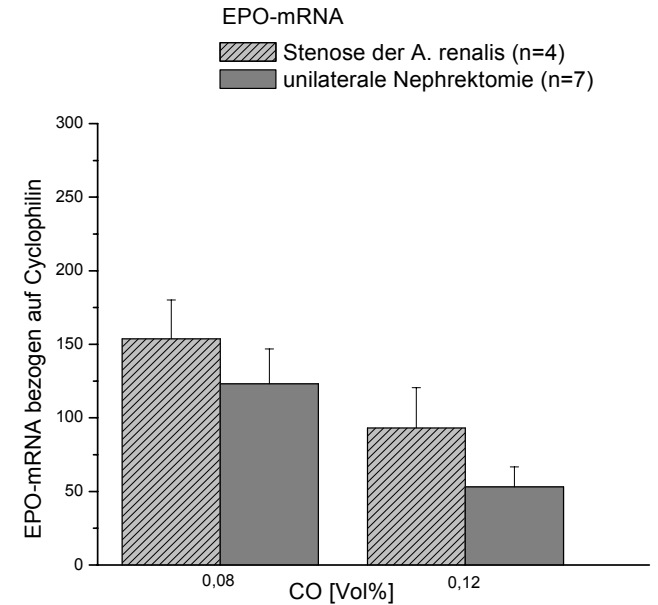


Abb. 30: EPO-mRNA-Gehalt in der Niere, bezogen auf Cyclophilin in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,08 und 0,12 Vol % CO über 4 Stunden); Ratten mit Stenosierung der A. renalis (ST) vs. einseitig nephrektomierte Ratten (NX)

Tab. 7: EPO-Serumkonzentrationen EPO-mRNA-Gehalt in der Niere und Körpergewicht bei Ratten mit Stenosierung der A. renalis (ST) vs. einseitig nephrektomierte Ratten (NX) in Abhängigkeit von der CO-Konzentration, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM

CO (Vol %)	Unilaterale Stenosierung der A. renalis (ST)				Unilaterale Nephrektomie (NX)			
	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n	EPO im Serum (mU/ml)	n	EPO-mRNA	n
0,00	12,9 \pm 0,4	2			9,9 \pm 0,9	2		
0,04	52,7 \pm 8	2			57,3 \pm 12,4	2		
0,06	170,9 \pm 19,7	2			215 \pm 61,2	4		
0,08	601,2 \pm 32,8	2	153,7 \pm 26,4	2	863,8 \pm 59,1	4	123,2 \pm 23,7	2
0,12	887,8 \pm 114,3	2	93,1 \pm 27,4	2	743,3 \pm 129,5	5	53,1 \pm 13,6	5
Gewicht (g)	287,8 \pm 2,8				299,8 \pm 3,3			
n	10		4		17		7	

3.4 Teil IV: Rolle der Leber bei der EPO-Produktion

3.4.1 EPO-mRNA-Expression in der Leber

Der hepatische EPO-mRNA-Gehalt betrug bei nicht operierten Tieren unter Normoxie etwa 30% der renalen EPO-mRNA. Nach milder hypoxischer Stimulation (0,05 Vol % CO über 4 Stunden) lag der EPO-mRNA-Gehalt in der Leber bei 4% des renalen EPO-mRNA-Gehaltes nach starker hypoxischer Stimulation (0,09 Vol % CO über 4 Stunden) bei 7% (Abb. 31 und Tab. 8).

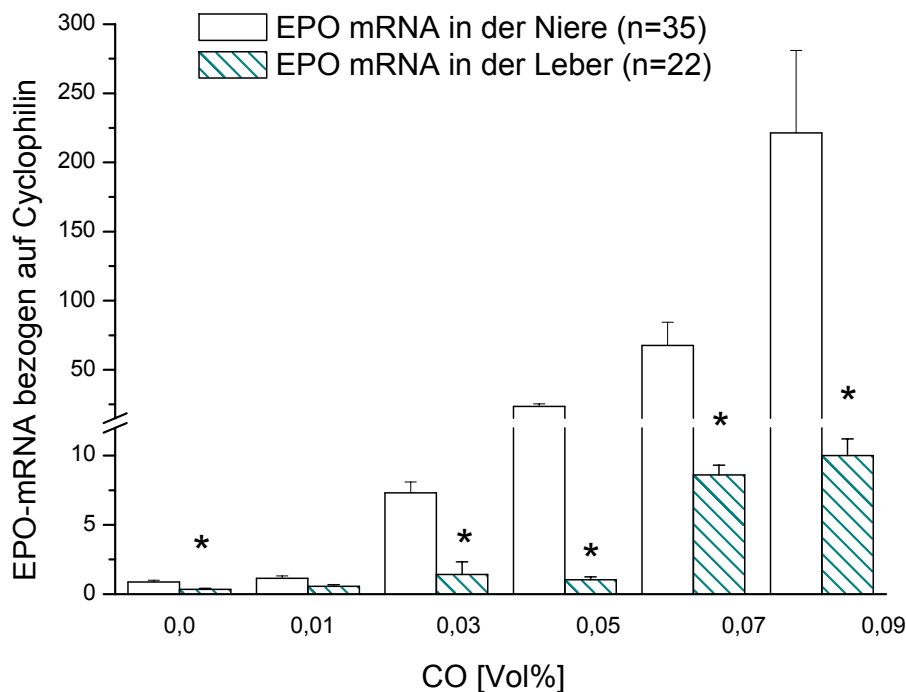


Abb. 31: EPO-mRNA-Gehalt in Leber und Niere in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,00 bis 0,09 Vol % CO über 4 Stunden); EPO-mRNA-Gehalt in der Niere vs. EPO-mRNA-Gehalt in der Leber, *= $p < 0,05$ vs. EPO-mRNA in der Niere

Tab. 8: Vergleich der EPO-mRNA-Gehalt in Niere und Leber in Abhängigkeit von der CO-Konzentration, EPO-mRNA-Gehalt der Niere vs. EPO-mRNA-Gehalt der Leber, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, $^* = p < 0,05$ vs. EPO-mRNA (Niere)

CO (Vol %)	EPO-mRNA (Niere)	n	EPO-mRNA (Leber)	n
0,00	0,9 \pm 0,1	16	0,4 \pm 0,1*	5
0,01	1,1 \pm 0,2	5	0,6 \pm 0,1	2
0,03	7,3 \pm 0,9	4	1,4 \pm 0,9*	3
0,05	23,6 \pm 1,8	5	1 \pm 0,2*	5
0,07	67,6 \pm 16,6	2	8,6 \pm 0,7*	3
0,09	221,4 \pm 59,5	3	10 \pm 1,2*	4
Gewicht (g)	290 \pm 12		297 \pm 8	
n (gesamt)	35		22	

3.4.2 EPO-mRNA-Expression in der Leber nach Arterialisierung der Pfortader

Der hepatische EPO-mRNA-Gehalt zeigte nach Arterialisierung der V. portae (**ART**) keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (**K-ART**) (Abb. 32 und Tab.9). Die 4-stündige CO-Exposition erfolgte bei 0,00, 0,06 und 0,10 Vol % CO.

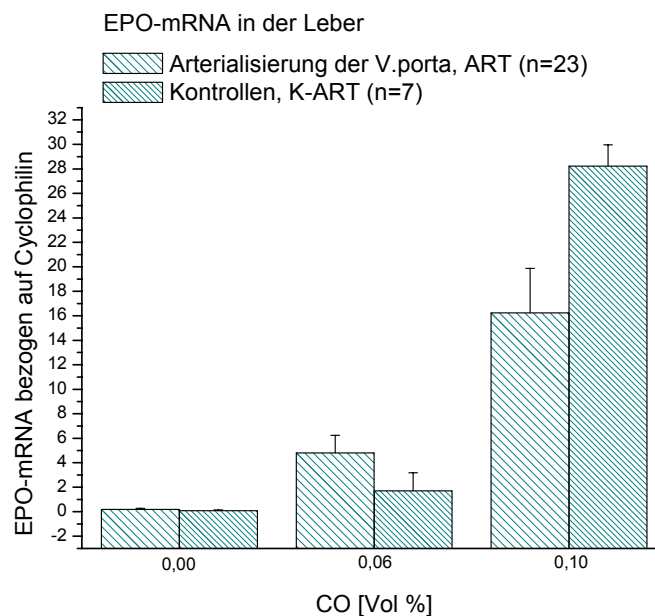


Abb. 32: EPO-mRNA-Gehalt in der Leber bezogen auf Cyclophilin in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0,06 und 0,10 Vol % CO über 4 Stunden); Ratten mit Arterialisierung der V. porta (ART) vs. scheinoperierte Ratten (K-ART)

Tab. 9: EPO-mRNA-Gehalt in der Leber und Körpergewicht bei Ratten mit Arterialisierung der V. porta (ART) vs. Kontrolltiere (K-ART); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, *=p<0,05 vs. K-ART

CO (Vol %)	EPO-mRNA (ART)	n	EPO-mRNA (K-ART)	n
0,00	0,2 ± 0,1	3	0,1 ± 0,1	2
0,06	4,8 ± 1,4	11	1,7 ± 1,5	2
0,10	16,2 ± 3,7	9	28,2 ± 1,8	3
Gewicht (g)	296,8 ± 3,5		302,1 ± 6	
n	23		7	

3.5 Teil V: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und EPO-Synthese

Unter Hypoxie (0,02-0,12 Vol % CO) wurde bei Ratten eine signifikant niedrigere PRA nach subtotaler Nephrektomie (**NXX**) im Vergleich zur Kontrollgruppe (**INN**) und zu einseitig nephrektomierten Ratten gemessen (**NX**) (Abb. 33 und Tab.10). Signifikante Unterschiede der PRA scheinoperierter Tiere mit Gabe von 0,85 % NaCl (**V-INN**), Propranolol (**P-INN**) oder NPY-Antagonist (**NA-INN**) wurden nicht gesehen. Auch konnte nach bilateraler Nierenarteriendeneravierung mit Gabe von 0,85 % NaCl (**V-DNX**), Isoproterenol (**I-DNX**) oder Neuropeptid Y (**N-DNX**) keine Veränderung der PRA im Vergleich zur Kontrollgruppe (V-INN) beobachtet werden. Ebenso zeigte sich nach akuter Ureterligatur (**UL0,5**), nach Nierenarterienstenosierung (**ST**) und nach Arterialisierung der Pfortader (**ART**) keine Veränderung der PRA im Vergleich zur Kontrollgruppe (**NX** bzw. **K-ART**).

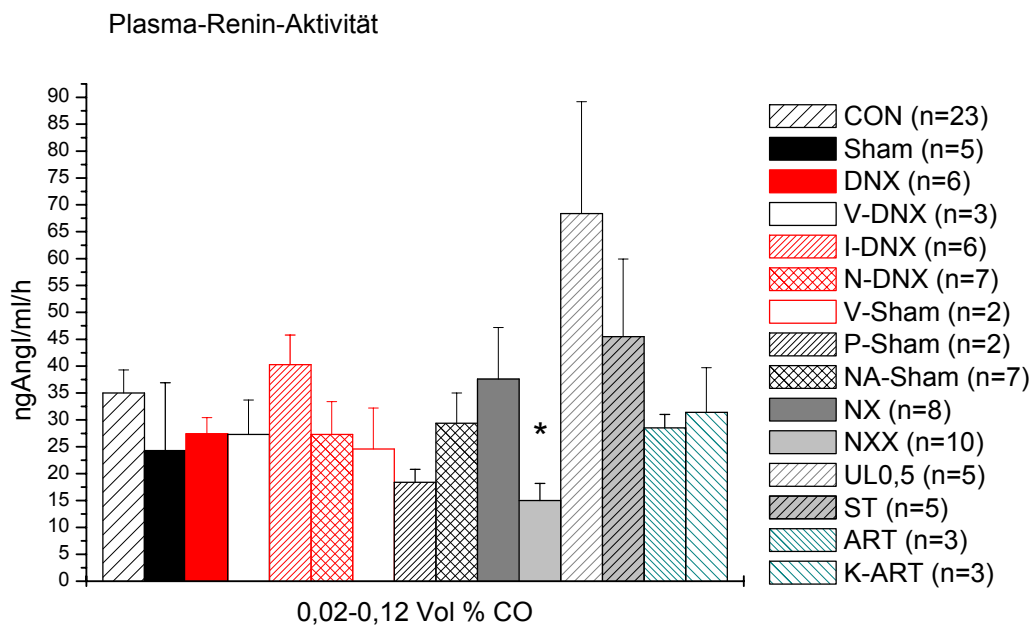


Abb. 33: PRA von Kontrolltieren (INN), scheinoperierten Kontrollen (SH) mit Gabe von 0,85 % NaCl (V-INN), Propranolol (P-INN), NPY-Antagonist (NA-INN), an der Nierenarterie denervierten Tieren (DNX) mit Gabe von 0,85 % NaCl (V-DNX), Isoproterenol (I-DNX), Neuropeptid Y (N-DNX), unilateral nephrektomierten Tiere (NX), subtotal nephrektomierten Tieren (NXX), nach akuter Ureterligatur (UL0,5), nach Nierenarterienstenosierung (ST), nach Pfortaderarterialisierung (K-ART) in Abhängigkeit von CO-Konzentrationen zwischen 0,02-0,12 Vol % CO, * $p < 0,05$ vs. NX

Tab. 10: PRA von Kontrolltieren (INN), scheinoperierten Kontrollen (SH) mit Gabe von 0,85 % NaCl (V-INN), Propranolol (P-INN), NPY-Antagonist (NA-INN), an der Nierenarterie denervierten Tieren (DNX) mit Gabe von 0,85 % NaCl (V-DNX), Isoproterenol (I-DNX), Neuropeptid Y (N-DNX), unilateral nephrektomierten Tiere (NX), subtotal nephrektomierten Tieren (NXX), nach akuter Ureterligatur (UL0,5), nach Nierenarterienstenosierung (ST), nach Pfortaderarterialisierung (K-ART) in Abhängigkeit von CO-Konzentrationen zwischen 0,02-0,12 Vol % CO, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. NX und INN

Versuchsgruppen (0,02- 0,14 Vol % CO)	PRA (ngAngl/ml/h)	n
INN (nicht operierte Kontrollen)	35,0 \pm 4,3	23
SH (scheinoperierte Kontrollen)	24,3 \pm 12,6	5
DNX (Nierenarteriendenervierung)	27,4 \pm 3,0	6
V-DNX (Vehikel, denerviert)	27,3 \pm 6,4	3
I-DNX (Isoproterenol, denerviert)	40,3 \pm 5,5	6
N-DNX (Neuropeptid Y, denerviert)	27,3 \pm 6,1	7
V-INN (Vehikel, scheinoperiert)	24,6 \pm 7,6	2
P-INN (Propranolol, scheinoperiert)	18,4 \pm 2,4	2
NA-INN (NPY-Antagonist, scheinoperiert)	29,4 \pm 5,6	7
NX (unilaterale Nephrektomie)	37,6 \pm 9,6	8
NXX (subtotale Nephrektomie)	15,0 \pm 3,2*	10
UL0,5 (akute Ureterligatur)	68,4 \pm 20,8	5
ST (Nierenarterienstenosierung)	45,5 \pm 14,4	5
ART (Pfortaderarterialisierung)	28,5 \pm 2,5	3
K-ART (Kontrollgruppe ART)	31,4 \pm 8,3	3
		95

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Teil I-V: Kontrollgruppen

Eine mögliche Auswirkung des experimentellen Stress durch Narkose und chirurgische Präparation auf die EPO-Sekretion wurde überprüft, indem scheinoperierte Kontrolltiere sieben Tage nach der Operation unterschiedlichen CO-Konzentrationen ausgesetzt wurden. Die Dosiswirkungskurve dieser Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Dosiswirkungskurve nicht operierter Tiere. Die Ergebnisse bestätigen die zuvor schon von Beynon et al (1977) erhobenen Daten. Diese Arbeitsgruppe konnte zwar 48 Stunden postoperativ einen Anstieg der EPO-Serumkonzentration bei scheinoperierten Tieren beobachten, nach einer Woche hatten sich die EPO-Serumkonzentrationen allerdings wieder normalisiert [25].

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, inwiefern die Infusion des Lösungsmittels (NaCl 0,85 %) die EPO-Sekretion beeinflusst. Auch hier unterschied sich die EPO-Serumkonzentration der Vehikel-Gruppe weder von scheinoperierten Tieren noch von nicht operierten Tieren. Folglich kann eine Beteiligung des postoperativen Stresses oder des Vehikels an den beschriebenen Effekten bei o.g.Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

4.1.2 Teil I: Nierendeneravierung

Die Nierendeneravierung wurde nach der von Bello-Reuss (1975) erstmals beschriebenen Methode durchgeführt [20]. Im Gegensatz zu vielen früheren Forschungsarbeiten wurde eine bilaterale Denervierung durchgeführt, um eventuell vorhandene Kompensationsmechanismen der kontralateralen Niere auszugleichen und den reno-renalen Reflexbogen auszuschalten [68]. Der Nachweis der erfolgreichen Denervierung wurde im vorliegenden Experiment durch die Bestimmung des Noradrenalingehaltes der beiden Nieren bestätigt. Ein Noradrenalin-Gehalt von unter 15% des Gehaltes bei innervierten Nieren wurde dabei als Maßstab angelegt. Mühlbauer und Osswald (1994) fanden

einen ähnlichen Abfall der Noradrenalin-Konzentration innerhalb von 18 Stunden [258]. Weiterhin ist bekannt, dass die renale Reinnervation erst nach 14 bis 24 Tagen auftritt [203]. Um eine Reinnervation zu vermeiden, wurden die Experimente am siebten postoperativen Tag durchgeführt.

Auch bei dieser Versuchsgruppe wurde überprüft, inwiefern die Infusion des Vehikels (NaCl 0,85 %) die EPO-Sekretion beeinflusst. Hierbei unterschieden sich EPO-Serumkonzentration und EPO-mRNA der Vehikel-Gruppe nicht von den Messwerten bilateral denervierter Tiere ohne Vehikel. Die zuvor erzielten Ergebnisse der DNX-Gruppe konnten mit der Vehikel-Gruppe gut reproduziert werden. Eine Beteiligung des Vehikels an den beschriebenen Effekten kann somit ausgeschlossen werden.

4.1.3 Teil III: Ureterligatur

In Vorversuchen konnte anhand der elektromagnetischen Blutflussmessung gezeigt werden, dass die auf die Ureterligatur folgende, initiale Vasodilatation der Nierenarterie mindestens 5 Stunden anhält (s. Abb. 11). Dies entspricht auch den Angaben in der Literatur [253;298;365]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei einer Versuchsdauer von 4 h und einer Ureterokklusion 30 min vor Versuchsbeginn die Erhöhung des RBF während des gesamten Versuchs bestand.

4.1.4 Teil III: Stenosierung der Arteria renalis

Sinkt der renale Perfusionsdruck unter 50 mmHg kommt es zu einem raschen Abfall der GFR und damit auch zur Störung der tubulären Rückresorption. Aufgrund des geringeren ATP-Bedarfs sinkt der Sauerstoffbedarf der Tubuluszellen. Der renale V_{O_2} ist in dieser Situation sehr gering und die arterielle O_2 -Sättigung annähernd der venösen gleich. Allerdings ergaben Messungen des venösen pO_2 nach Stenosierung der Nierenarterie, dass dieser deutlich abfällt, wenn der RBF unter 60% sinkt. Auch scheint eine Reduktion des RBF von mindestens 50% für eine Auswirkung auf die EPO-Produktion Voraussetzung zu sein [101;283]. Aus diesem Grund wurde bei der

vorliegenden Arbeit eine 70%ige Stenosierung der Nierenarterie durchgeführt. Die Reduktion des RBF wurde anhand eines elektrischen Flowmeters überprüft.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Teil I: Einfluss des autonomen Nervensystem auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass das autonome Nervensystem an der Regulation der EPO-Sekretion in der Niere beteiligt ist [25;94;95;96;100;141]. Unklarheit besteht jedoch, ob die renalen Nerven die EPO-Synthese im Sinne einer Supprimierung oder Stimulation regulieren. Neuere Studien verneinen sogar einen direkten Zusammenhang zwischen renaler Innervierung und EPO-Synthese [76]. Auch erschweren Unterschiede in Studiendesign und Messmethodik den Vergleich und die Interpretation dieser Forschungsarbeiten. Untersuchungen zu bilateraler renaler Denervierung sowie zu Dosiswirkungsbeziehungen von hypoxischem Stimulus und EPO-Sekretion wurden bisher nicht publiziert. Eindeutige wissenschaftliche Ergebnisse liegen somit nicht vor. Aus diesem Grund untersucht die vorliegende Studie, ob eine beidseitige renale Denervierung die CO-stimulierte EPO-Sekretion bei Ratten beeinflusst. Die Experimente wurden an wachen Sprague-Dawley-Ratten unter normoxischen und unterschiedlich starken hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde eine Dosiswirkungskurve der EPO-Serumkonzentration in Abhängigkeit von CO-Konzentrationen zwischen 0,00 und 0,12 Vol % CO erstellt, sowie der EC_{50} -Wert berechnet. Weiterhin wurde geprüft, ob die EPO-Sekretion durch die Neurotransmitter Neuropeptid Y und Noradrenalin verändert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Ratten nach bilateraler renaler Denervierung eine signifikant erhöhte EPO-Serumkonzentration nach 4-stündiger CO-Exposition von 0,06 Vol % CO in der Einatemluft im Vergleich zu innervierten Kontrolltieren gemessen. Der signifikante Unterschied der EPO-

Serumkonzentrationen zwischen denervierten Tieren und Kontrollgruppe zeigte sich auch im EPO-mRNA-Gehalt der Niere. Bei höheren (0,08-0,12 Vol %) und niedrigeren (0,00-0,04 Vol %) CO-Konzentrationen unterschieden sich die EPO-Serumkonzentrationen und der renale EPO-mRNA-Gehalt der denervierten Tiere nicht von der Kontrollgruppe. Ratten nach renaler Denervierung verstarben vor Versuchsende, wenn die CO-Exposition 0,12 Vol % überschritt. Die Dosiswirkungskurve nach bilateraler renaler Denervierung zeigte eine Linksverschiebung. Der EC_{50} -Wert lag bei denervierten Tieren niedriger als bei der Kontrollgruppe. Die PRA der denervierten Tiere unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollwerten.

Der oben beschriebene Anstieg der EPO-Serumkonzentration bestätigt die schon von Beynon et al. beschriebene Wirkung der renalen Denervierung auf die EPO-Produktion [25]. Beynon et al. gehen nach ihren Ergebnissen davon aus, dass das autonome Nervensystem eine wichtige Rolle bei der Regulation der EPO-Sekretion spielt. Unter Verwendung eines Bioassays wiesen sie nach 6-stündiger Hypoxie-Exposition (Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch) bei Ratten 7 Tage nach unilateraler renaler Denervierung und kontralateraler Nephrektomie einen Anstieg der EPO-Serumkonzentration nach. Die Vollständigkeit der renalen Denervierung, z.B. durch Katecholaminmessungen in der Niere, wurde von dieser Arbeitsgruppe nicht überprüft. Auch deuten die Autoren ihre Ergebnisse so, dass eine Sensibilisierung der denervierten Niere gegenüber zirkulierenden Katecholaminen für den Anstieg der EPO-Sekretion verantwortlich ist. Eine direkte Regulation der EPO-Synthese durch die renalen Nerven wird von Beynon et al. nicht postuliert.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stehen die Arbeiten von Fink und Fisher (1976) und Eckardt et al. (1992). Fink und Fisher beobachteten 1 bis 2 Wochen nach bilateraler renaler Denervierung eine Senkung der EPO-Serumkonzentration bei Kaninchen nach 5-stündigem hypoxischem Stimulus (0,42atm O_2), dagegen keine Veränderung der EPO-Serumkonzentration bei gleichbehandelten Tieren unter 18-stündiger Hypoxie-

Exposition [76;93]. Unterschiedliche Versuchsprotokolle mit unterschiedlicher Stärke und Dauer der Hypoxie-Exposition und verschiedenen Messmethoden der EPO-Serumkonzentration könnten die Divergenzen zwischen obigen Studien und der eigenen Arbeit begründen.

Ein weiterer Unterschied der CO-Hypoxie gegenüber der von Fink und Fisher verwendeten hypoxischen Hypoxie liegt im verzögerten Abfall der COHb-Konzentration nach Beendigung der CO-Exposition [8] und der dadurch erschwerten Sauerstoffabgabe im peripheren Gewebe. Die funktionelle Hypoxie, und damit auch der Stimulus für die EPO-Produktion, bleiben somit in dem für die Präparation benötigten Zeitraum erhalten. Um die EPO-Serumkonzentration zu bestimmen, verwendeten obige Autoren eine indirekte Methode (polycythemic mice assay). Verglichen mit den heutzutage verwendeten Immunoassays ist dieser Bioassay weniger sensitiv [177].

Eckardt et al. (1992) fanden nach unilateraler Denervierung bei einer CO-Hypoxie von 0,1 Vol % CO über 4 Stunden keine Veränderung der EPO-Serumkonzentration sowie der EPO-mRNA und postulierten somit, dass eine renale Denervierung keinen Einfluss auf die EPO-Sekretion nimmt. Eckardt et al. denervierten nur unilateral. Die kontralaterale Niere diente als Kontrolle. Desweiteren wurde von diesen Autoren die EPO-Sekretion nur bei 0,1 Vol % CO, nach Hämorrhagie sowie unter normobarer Hypoxie untersucht [76]. In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls nach Exposition von 0,1 Vol % CO kein Unterschied in der EPO-Serumkonzentration zwischen denervierten und Kontrolltieren gesehen. Allerdings konnte wir nach milderem hypoxischem Stimulus (0,06 Vol % CO) einen signifikanten Anstieg der EPO-Serumkonzentration in denervierten Tieren zeigen. Eine Dosisabhängigkeit der Hypoxie auf die EPO-Sekretion war von o.g. Autoren nicht untersucht worden.

Die aufgetretenen Veränderungen der EPO-Serumkonzentration können sowohl direkte als auch indirekte Auswirkungen der renalen Denervierung sein. In verschiedenen Modellen konnte bisher gezeigt werden, dass renale sympathische Nervenfasern an der Regulation der tubulären Natrium- und Wasserreabsorption beteiligt sind. Es ist bekannt, dass durch eine renale

Denervierung die Elektrolyt-Reabsorption im proximalen Tubulus reduziert wird [20;65;305]. Da für die Elektrolyt-Reabsorption große Mengen an Sauerstoff benötigt werden, gilt der proximale Tubulus als der bestimmende Faktor für den renalen Sauerstoffverbrauch [64]. Eine renale Denervierung könnte folglich über einen verminderten Sauerstoffverbrauch zu einer Reduktion der EPO-Produktion führen. Allerdings muß berücksichtigt werden, dass durch die erhöhte Durchblutung der Niere unter Hypoxie und die Kohlenmonoxid-bedingte Vasodilatation die glomeruläre Filtrationsrate und damit auch die tubuläre Resorptionsarbeit ansteigt. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die innervierte Niere unter mittlerem hypoxischen Stimulus die Möglichkeit hat, durch Vasokonstriktion den Energieverbrauch zu senken und deshalb eine signifikant geringere EPO-Serumkonzentration als die denervierte Niere zeigt. Bei niedriger Hypoxie-Exposition scheint der Stimulus für eine Gegenregulation der Niere jedoch nicht auszureichen wohingegen bei hohen CO-Konzentrationen die Kompensationskapazität der Niere möglicherweise überschritten wird.

Ferner gibt es Hinweise dafür, dass die Renin-Sekretion von den renalen Nerven reguliert wird [158;281]. Die in der Literatur beschriebene Senkung der PRA nach renaler Denervierung [42;102] lässt sich allerdings aus den Daten der vorliegenden Studie nicht nachvollziehen. Es zeigte sich zwar eine leichte Senkung der PRA bei denervierten Tieren, die im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant war. Ein direkter Zusammenhang zwischen Reninausschüttung und EPO-Synthese wird jedoch von den meisten Autoren verneint [73;157;244;369]. Möglicherweise kann das Renin-Angiotensin-System die EPO-Synthese aufgrund einer ischämischen Hypoxie durch Reduktion des RBF indirekt stimulieren. Dieser Effekt konnte allerdings nur bei Renin-Konzentrationen beobachtet werden, die deutlich höher waren als diejenigen, die in der vorliegenden Studie gemessen worden waren [127].

Um zu klären, ob die signifikant erhöhten EPO-Serumkonzentrationen bei denervierten Ratten unter 0,06 Vol % CO über β -Rezeptoren vermittelt wurden,

erhielten scheinoperierte Kontrolltiere mit intakter renaler Innervation vor CO-Exposition Propranolol (entsprechend den Versuchen von Fink et al., 1975 [96]). Ratten mit beidseits denervierten Nieren wurde dagegen Isoproterenol in subpressorischer Dosierung [237] verabreicht.

Um eine genauere Aussage über den Einfluss der verschiedenen Neurotransmitter auf die EPO-Sekretion machen zu können, wurde erstmals untersucht, ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen NPY und der EPO-Sekretion gibt. Hierzu wurde beidseits denervierten Ratten [Pro34]-substituiertes Peptid YY (PYY) intravenös über Alzet[®]-Pumpen verabreicht. Peptid YY ist strukturell ähnlich aufgebaut wie Neuropeptid Y und bindet an die gleichen Rezeptoren. [Pro34]-substituiertes Peptid YY besitzt eine Präferenz für Y₁- und Y₅-Rezeptoren. Über diese Rezeptoren wird die Nierenfunktion durch NPY beeinflusst [29]. Um indirekte Wirkungen auf die EPO-Sekretion zu vermeiden, wurde PYY in subpressorischer Dosierung verabreicht [29]. Ebenso erhielten Tiere mit intakter renaler Innervation einen für den Y₁-Rezeptor spezifischen NPY-Antagonisten. Der Y₁-Rezeptor ist der einzige NPY-Rezeptor, dessen mRNA-Expression in der Niere nachgewiesen werden konnte [362]. Über den Y₅-Rezeptor wird die Nierenfunktion zwar ebenfalls beeinflusst, vermutlich aber über extrarenale Mechanismen [31]. Der Y₁-Antagonist wurde ebenfalls in subpressorischer Dosierung verabreicht.

Nach Gabe von [Pro34]-Peptid YY fand sich eine signifikante Senkung der EPO-Serumkonzentration und renalen mRNA bei denervierten Tieren (N-DNX) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel, 0,85 % NaCl, V-DNX). Dagegen wurde durch Verabreichung des spezifischen Y₁-Rezeptorantagonisten eine Erhöhung der EPO-Produktion bei denervierten Tieren erzielt, die im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (Vehikel, 0,85 % NaCl, V-INN) jedoch nicht signifikant verschieden war.

Nach Gabe von Propranolol wurden bei Tieren mit intakter renaler Innervation (P-INN) leicht erhöhte EPO-Serumkonzentrationen gemessen im Vergleich zur Kontrollgruppe (V-INN), wohingegen die Gabe von Isoproterenol die EPO-

Serumkonzentration denervierter Tiere senkte, jedoch nicht signifikant. Der EPO-mRNA-Gehalt der Nieren war ebenfalls nicht signifikant verändert.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, konnten zwei andere Arbeitsgruppen keinen Effekt der adrenergen Stimulation auf die EPO-Sekretion nachweisen [22;165]. Dagegen lässt sich die von mehreren Autoren beschriebene Steigerung der EPO-Synthese nach β -adrenerger Stimulation aus den Daten der hier vorliegenden Studie nicht nachvollziehen [94;95;100;118;181;212;295]. Im Gegensatz zur eigenen Studie wurden diese Daten jedoch bei intakter renaler Innervation erhoben. Zusammen mit den Resultaten der früheren Untersuchungen lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie jedoch vermuten, dass eine intakte renale Innervation Voraussetzung für eine Auswirkung der β -adrenergen Stimulation auf die EPO-Sekretion ist. Weiterhin lassen oben genannte Daten darauf schließen, dass eine durch zirkulierende Katecholamine ausgelöste β -adrenerge Aktivierung für die Regulation der EPO-Produktion unter mildem hypoxischem Stimulus von geringer Bedeutung ist.

Bei scheinoperierten Tieren mit intakter renaler Innervation konnte in der vorliegenden Studie nach β -adrenerger Blockade keine Veränderung der EPO-Serumkonzentration beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt trotz unterschiedlicher Versuchsprotokolle die Resultate einiger früherer Untersuchungen [95;118;135]. Widersprüchlich zur eigenen Arbeit ist dagegen die Studie von Fink et al. (1975). Diese Autoren fanden, dass Propranolol die EPO-Sekretion nach 18 h Hypoxie bei Kaninchen senkte. Diese Ergebnisse konnten von den gleichen Autoren in einer späteren Arbeit nach 5 h Hypoxie allerdings nicht reproduziert werden. Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Studie die EPO-Serumkonzentration anhand einer weniger sensitiven, indirekten Methode (Bioassay) gemessen [96].

Obige Daten lassen vermuten, dass NPY über den Y_1 - oder Y_5 - Rezeptor an der Regulation der EPO-Synthese im Sinne einer tonischen Hemmung beteiligt

ist. Mögliche indirekte Einflüsse von NPY auf die EPO-Sekretion müssen jedoch auch hier berücksichtigt werden:

Es ist bekannt, dass NPY und PYY über Y_1 -Rezeptoren die β_1 -adrenozeptor-stimulierte Reninsekretion senken [10;29]. Der juxtaglomeruläre Apparat wird von NPY-enthaltenden Nervenendigungen innerviert und exprimiert Y_1 -Rezeptor-mRNA [31]. Eine indirekte Beeinflussung der EPO-Sekretion aufgrund einer veränderten PRA ist somit möglich. Die bei diesem Versuch beobachtete PRA unterscheidet sich jedoch nur geringfügig von den Werten, die bei der Vehikel-Gruppe beobachtet wurden. Weiterhin ist ein Einfluss von [Pro34]-Peptid YY auf die PRA in der hier verwendeten subpressorischen Dosierung unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu der durch [Pro34]-Peptid YY hervorgerufenen Senkung der EPO-Serumkonzentration, vermochte der spezifische NPY-Antagonist die EPO-Serumkonzentration nur gering zu steigern. Die Ursache für die unterschiedliche Wirkstärke von Agonist und Antagonist kann in deren unterschiedlicher Rezeptoraffinität begründet sein. Während der spezifische Y_1 -Antagonist eine sehr hohe Affinität für den Y_1 -Rezeptor besitzt und selektiv an diesen bindet, werden durch [Pro34]-Peptid YY sowohl Y_1 als auch Y_5 -Rezeptoren stimuliert. Auch kann eine Stimulierung des Y_2 -Rezeptors durch [Pro34]-Peptid YY nicht ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass über den Y_2 -Rezeptor die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität im distalen Tubulus gesteigert wird [278;279]. Da Eckardt et al. festgestellt haben, dass die EPO-Produktion mit der Funktion des proximalen Tubulus korreliert [75], könnte es anhand dieses Mechanismus zu einer Einflussnahme auf die renale EPO-Produktion kommen.

Bischoff et al. (1997) konnten zeigen, dass die durch NPY ausgelöste renale Vasokonstriktion über den Y_1 -Rezeptor vermittelt wird. Unter physiologischen Bedingungen ist NPY allerdings nur ein schwacher Vasokonstriktor, kann aber während starker sympathischer Aktivität, wie z.B. unter Hypoxie, die vasokonstriktorisches Eigenschaften seiner Ko-transmitter ATP (P2X-

Rezeptoren) und Noradrenalin (α -Rezeptoren) verstärken [275]. Wird dieser Effekt durch einen spezifischen Antagonisten blockiert, könnte es durch eine Erhöhung des RBF zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung der Niere und folglich zu einer Supprimierung der EPO-Produktion kommen. Diese Wirkungsweise könnte dazu beigetragen haben, dass bei Gabe des spezifischen Y_1 -Antagonisten direkte Effekte auf die EPO-Sekretion überdeckt und somit nicht die Signifikanz erreicht wurde, die durch [Pro34]-Peptid YY erzielt worden war. Allerdings muss auch hier berücksichtigt werden, dass sich bei Erhöhung des RBF die glomeruläre Filtration und folglich die tubuläre Resorptionsarbeit ebenfalls erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die renalen Nerven an der Regulation der EPO-Synthese beteiligt sind. Dies zeigte sich besonders deutlich bei mittlerem hypoxischem Stimulus (0,04 und 0,06 Vol % CO). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die EPO-Sekretion durch direkte Beteiligung des Neurotransmitters NPY über Y_1 -oder Y_5 -Rezeptoren tonisch gehemmt wird.

4.2.2 Teil II: Einfluss der Reduktion des Nierengewebes auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

Im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz kommt es regelmäßig zur normochromen hyporegenerativen Anämie. Sie wird manifest, wenn die GFR unter 30 ml/min abfällt [49]. Obwohl noch andere Faktoren an der Pathogenese dieser Anämie beteiligt sind [312], ist der relative EPO-Mangel eine der Hauptursachen [199;235]. Die zugrunde liegende Pathophysiologie ist jedoch noch unklar. Bezogen auf Gesunde ist die EPO-Serumkonzentration urämischer Patienten häufig normal, bezogen auf den gewöhnlich vorliegenden Hkt von 20-30%, aber inadäquat niedrig [263]. Um die Auswirkungen einer insuffizienten Nierenfunktion auf die EPO-Produktion zu untersuchen, eignet sich das Modell der subtotalen 5/6 Nephrektomie im Tierversuch. Da die Adaptionsmechanismen des verbleibenden Nierengewebes jedoch sehr komplex sind (s. Einleitung), ist es schwierig, einen genauen

Regulationsmechanismus für die veränderte EPO-Produktion und die daraus resultierende Veränderung der Erythropoese abzugrenzen. Bisherige Erklärungsversuche sind deshalb widersprüchlich.

Aus diesem Grund untersucht die vorliegende Arbeit, inwiefern bei Niereninsuffizienz noch das Potential vorhanden ist, auf zunehmende Hypoxie mit einer Steigerung der EPO-Produktion zu reagieren. Hierzu wurden subtotal nephrektomierte Tiere unterschiedlichen CO-Konzentrationen exponiert und eine Dosiswirkungskurve erstellt. Als Vergleichsgruppe dienten einseitig nephrektomierte und nicht operierte Tiere.

Es konnte gezeigt werden, dass die EPO-Synthese in der Restniere sowohl bei subtotal nephrektomierten Tieren als auch bei unilateral nephrektomierten Tieren bei starkem hypoxischem Stimulus (0,10 und 0,12 Vol % CO) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert war. Die Dosiswirkungskurve zeigte bei einseitig und bei subtotal nephrektomierten Ratten bis 0,08 Vol % CO den gleichen Verlauf wie die Dosiswirkungskurve der Kontrollgruppe. Ab 0,08 Vol % CO verläuft die Dosiswirkungskurve der einseitig und der subtotal nephrektomierten Tiere horizontal. Die Dosiswirkungskurve der Kontrollgruppe steigt dagegen weiter an, d.h. die maximale Kapazität der renalen EPO-Sekretion ist bei Verminderung des funktionellen Nierengewebes eingeschränkt.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass auf die Reduktion der renalen Masse eine Hypertrophie des verbleibenden Nierengewebes folgt, sowohl nach unilateraler als auch nach subtotaler Nephrektomie. Vier Wochen nach Entfernung von 2/3 der Gewebemasse einer Niere kann diese jedoch annähernd das Gewicht einer intakten Niere erreichen [149;294;339]. Die Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse zeigt deutlich, dass die Kapazität zur EPO-Synthese in der Restniere während des Prozesses der Hypertrophie nur bis zu einem bestimmten Grad gestiegen ist. Im erhaltenen und hypertrophierten Nierengewebe ist zwar noch Potential für eine Steigerung der EPO-Synthese unter Hypoxie vorhanden (bis zu 30fache Steigerung der EPO-Serumkonzentration bei 5/6 nephrektomierten Tieren,

75fache Steigerung bei unilateral nephrektomierten Tieren im Vergleich zur Normoxie), auf starken hypoxischen Stimulus kann die Niere jedoch nicht mehr adäquat reagieren. Die EPO-mRNA-Menge pro Gramm Nierengewebe in der Restniere betrug bei starkem hypoxischem Stimulus (0,12 Vol % CO) nach 5/6-Nephrektomie etwa 25% und nach einseitiger Nephrektomie etwa 30% des EPO-mRNA-Gehaltes der Nieren der Kontrolltiere. Diese Ergebnisse bestätigen die schon von anderen Arbeitsgruppen beschriebene Supprimierung der EPO-Sekretion durch die Reduktion von Nierenmasse [19;221;291;339]. Zusammen mit den Daten früherer Untersuchungen von Tan et al. (1991) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Funktion der EPO-produzierenden Zellen in der Niere im Gegensatz zum restlichen Nierenparenchym nur unzureichend an die veränderten Bedingungen nach Entfernung von Nierengewebe adaptiert wird [339].

Es ist bislang unklar, warum die Kapazität zur EPO-Synthese im Restnierengewebe nicht ansteigt. Wie schon von Priyadarshi et al. (2002) vorgeschlagen, könnte hierfür schlichtweg die Reduktion der EPO-produzierenden Fibroblasten durch die chirurgische Reduktion der Nierenmasse verantwortlich sein [291]. Die wesentliche Regulation der renalen EPO-Produktion beruht auf Veränderungen der Anzahl EPO-exprimierender Fibroblasten, die nach einer „Alles-oder-nichts-Regel“ EPO produzieren. Werden durch chirurgische Präparation Teile der Niere entfernt, ist dadurch die Rekrutierung weiterer EPO-exprimierender Zellen nicht möglich und die Niere kann bei starkem hypoxischem Stimulus keine adäquate Menge EPO mehr produzieren.

Ein weiteres Erklärungsmodell für die Senkung der EPO-Sekretion im Restnierengewebe könnte eine von Priyadarshi et al. (2002) postulierte Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes in der Niere sein. Diese Autoren fanden in der Restniere nach subtotaler Nephrektomie einen im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhten Sauerstoffpartialdruck sowie einen gleichzeitig verringerten Sauerstoffverbrauch [291]. Da der Sauerstoffpartialdruck ein wichtiger Regulator für die EPO-Produktion ist, könnte ein vermehrter

Sauerstoffgehalt im Nierengewebe für obige Beobachtungen verantwortlich sein. Da in der vorliegenden Studie der Sauerstoffgehalt im Nierengewebe nicht gemessen wurde, bleibt unklar, inwieweit die EPO-Produktion hierdurch beeinflusst wurde. Zudem sind weitere Forschungsarbeiten notwendig, um diese Hypothese zu prüfen.

4.2.3 Teil III: Einfluss der renalen Durchblutung auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion

Unter normalen Bedingungen dienen 90 % des Blutvolumens, das für die Nieren bestimmt ist, der Durchblutung der Nierenrinde. Im ischämischen Nierenversagen ist die Rindendurchblutung auf etwa 60 % des Ausgangswertes reduziert, während die Durchblutung des Nierenmarks sogar leicht erhöht ist [36]. Da für die Elektrolyt-Sekretion und Reabsorption große Mengen von Sauerstoff benötigt werden, reagiert die Niere sehr empfindlich auf Durchblutungsschwankungen und Hypoxie. Vor allem die Zellen der proximalen Tubuli, in deren unmittelbarer Nähe sich die EPO-produzierenden Zellen befinden [239], sind nicht in der Lage, ihren ATP-Bedarf durch anaerobe Glykolyse zu decken. Sie gelten als der bestimmende Faktor für den renalen Sauerstoffverbrauch [64;196;217;347]. Es kommt in diesem Bereich unter Hypoxie verstärkt zu einem Defizit energiereicher Verbindungen [38;84]. Da die EPO-Genexpression in den peritubulären Fibroblasten durch den Sauerstoffpartialdruck im Nierengewebe bestimmt wird [266;297;346], vermutet man, dass Änderungen der proximal tubulären Funktion eine Auswirkung auf die EPO-Sekretion haben. Ein direkter Hinweis hierfür konnte von Eckardt et al. (1989) erbracht werden [75].

Um die Reabsorptionsarbeit der Tubuli zu hemmen, eignet sich als experimentelles Modell die chronische Ureterligatur. Die daraus resultierenden hämodynamischen und tubulären Veränderungen der Niere sind abhängig von Dauer und Schweregrad der Obstruktion und führen zu einer Verringerung der renalen Durchblutung und damit zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch [64]. Im Unterschied zur chronischen Ureterobstruktion wird bei einer akuten

Ureterligatur (bis zu 8 Stunden) der renale Sauerstoffverbrauch erhöht, bedingt durch eine initiale Vasodilatation der renalen Gefäße.

Obwohl es Hinweise für einen direkten Zusammenhang von proximal tubulärer Funktion und EPO-Produktion gibt [75;98;246] und in einer neueren Studie eine initial supprimierte EPO-Produktion nach 24-stündiger Ureterligatur gemessen werden konnte [267], sprechen doch einige ältere Arbeiten gegen einen Einfluss der experimentellen chronischen Ureterokklusion auf die EPO-Produktion [182;301]. Ein möglicher Einfluss des veränderten Sauerstoffpartialdruckes in der akut gestauten Niere auf die EPO-Produktion wurde bislang nicht untersucht.

Um dies zu prüfen, untersucht die vorliegende Arbeit die Auswirkung der akuten und chronischen Ureterokklusion auf die CO-stimulierte EPO-Sekretion an wachen Ratten. Weiterhin wurde geprüft, ob die EPO-Sekretion durch Verringerung der renalen Durchblutung verändert werden kann. Dazu wurde die linke Nierenarterie sieben Tage vor CO-Exposition stenosiert. Es zeigte sich, dass die EPO-Serumkonzentration und der renale EPO mRNA Gehalt bei Ratten mit akuter Ureterligatur nach 4-stündiger Hypoxie-Exposition (0,06 Vol % CO) signifikant erhöht war im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach chronischer Ligatur des linken Ureters wurde eine signifikante Verringerung der EPO-Serumkonzentration und des EPO-mRNA-Gehaltes der linken Niere im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Exposition von 0,06 Vol % CO gemessen. Eine 70%ige Stenosierung der Nierenarterie änderte die EPO-Serumkonzentration sowie die EPO-mRNA in der Restniere unter verschiedenen hypoxischen Stimuli (0,04 Vol % bis 0,12 Vol % CO) nicht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass die EPO-Produktion durch die hämodynamischen und tubulären Veränderungen nach akuter Ureterokklusion beeinflusst wird. Es ist bekannt, dass sich GFR und tubuläre Transportarbeit direkt proportional zu Veränderungen des RBF verhalten [345]. Folglich führt die akute Ureterligatur mit einem gesteigerten RBF zu einer

vermehrten tubulären Resorptionsarbeit mit gesteigertem Sauerstoffverbrauch. Hierdurch bedingt sinkt möglicherweise der Sauerstoffpartialdruck im Nierengewebe und führt zur Stimulierung der EPO-Synthese in den peritubulären Fibroblasten. Der stark ansteigende hydrostatische Druck in den Tubuli und das Ödem des Nierenparenchyms scheint zu keiner nennenswerten Funktionseinschränkung der Epozyten zu führen.

Von anderen Autoren wurde bis dato die EPO-Serumkonzentration innerhalb weniger Stunden nach Ureterokklusion nicht bestimmt. Die Zeitspanne der Messungen reichte bei bisherigen Forschungsarbeiten von Tag 1 bis Tag 61 nach Ureterligatur. Unsere Ergebnisse weisen jedoch im Einklang mit der Hypothese von Eckardt et al. (1989) daraufhin, dass die EPO-Produktion abhängig von der tubulären Resorptionsarbeit und damit des Sauerstoffverbrauchs der proximalen Tubuli ist [75;267].

Nach 24-stündiger Ureterligatur beobachteten wir eine signifikante Supprimierung der EPO-Produktion. Hingegen berichten Reissmann et al. (1960) und Jelkmann et al. (1988) über eine unveränderte Hypoxie-induzierte EPO-Produktion in der gestauten Niere nach 4-tägiger Ureterokklusion [182;301]. Diesen Ergebnissen stehen allerdings die neueren Arbeiten von Maxwell et al. (1997) und Nečas et al. (1998) gegenüber. Übereinstimmend mit den eigenen Messungen konnten Nečas et al. (1998) beobachten, dass der EPO-mRNA-Gehalt der Nieren 1 bis 2 Tage nach unilateraler Ureterligatur supprimiert war. Zwischen dem 4. und 22. Tag nach Ureterligatur konnte die hydronephrotische Niere ihre ursprüngliche Kapazität zur EPO-Produktion wieder erlangen [267]. Zuvor hatten Maxwell et al. (1997) demonstriert, dass die Hypoxie-induzierte EPO-Genexpression 5 bis 9 Tage nach Ligatur des Ureters eindeutig abgeschwächt war [239].

Die chronische Ureterligatur führt zur Reduktion des RBF und folglich zu einer verminderten tubulären Transportarbeit bis hin zur Einstellung der Filtration und Resorptionsarbeit [271]. Hinzu kommt, dass die Harnstauung bereits bei 24-stündiger Ureterokklusion zu starken Veränderungen und Schädigungen

(Druckatrophie) des Nierenparenchyms geführt hat. Die akute Harnstauung verursacht zunächst eine Größenzunahme der Niere, die hauptsächlich durch ein Ödem des Nierenparenchyms bedingt ist [252]. Später kommt es zu einer Druckatrophie des Nierenparenchyms und einer Zerstörung der Tubuli [330]. Möglicherweise entsteht hierbei ein Funktionsverlust der EPO-produzierenden Fibroblasten und dadurch eine verminderte EPO-Genexpression im Nierengewebe. Es muss zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt bleiben, ob die beschriebenen Auswirkungen der chronischen Ureterligatur auf die EPO-Sekretion durch einen verminderten O₂-Verbrauch der proximalen Tubuli oder einen Funktionsverlust des renalen Gewebes zurückzuführen sind. Auch kann eine Interaktion der reternierten Stickstoffverbindungen mit dem O₂-Sensing-Mechanismus, der die Synthese des Hormons reguliert, nicht ausgeschlossen werden. Zusammen mit den Daten früherer Untersuchungen von Maxwell et al. (1997) [239] kann jedoch aus obigen Ergebnissen geschlossen werden, dass die EPO-produzierenden Zellen in der geschädigten Niere nicht völlig refraktär gegenüber hypoxischen Stimuli sind. Warum es allerdings zu der von Maxwell et al. beschriebenen Steigerung der EPO-Sekretion ab dem 4. Tag nach Ureterligatur kommt, bleibt unklar. Die Autoren ziehen als Ursache für die transiente Supprimierung der EPO-Produktion eine Desensibilisierung der EPO-produzierenden Zellen durch das Häm-Eisen der bei Nierenstauung vermehrt exprimierten Häm-Oxygenase-mRNA in Betracht [239]. Eine Beteiligung von Eisen an der Regulation der EPO-Produktion wurde bereits schon früher diskutiert [87;155]. Ein endgültiger Beweis hierfür steht jedoch noch aus.

In der vorliegenden Studie konnte die EPO-Produktion durch Verringerung der renalen Sauerstoffzufuhr, d.h. durch die Stenosierung der Nierenarterie bei Ratten unter geringer und starker hypoxischer Stimulation nicht verändert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten einiger älterer Studien. Diese Autoren fanden unter Verwendung modifizierter Golblatt-Clips nahezu keinen Einfluß der Nierenarterienstenose auf die EPO-Produktion [54;57;247]. Diese Ergebnisse könnten folgendermaßen erklärt werden: Die Nierendurchblutung

unterliegt einer Autoregulation. Perfusionsdrücke zwischen 80 und 180 mmHg bewirken weder eine Änderung des renalen Blutflusses noch der GFR [348]. Sinkt der Perfusionsdruck unter 80mmHg, so sinkt ebenfalls der Sauerstoffverbrauch der Niere, bedingt durch eine Senkung der GFR und damit geringerer Reabsorptionsarbeit der Tubuluszellen [271]. Pagel et al (1988) hatten festgestellt, dass eine Verringerung der renalen Blutzufuhr im Vergleich mit einer Verringerung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes (anämische Hypoxie) nur ein geringer Stimulus für die EPO-Sekretion ist [283]. Sinkt der RBF jedoch unter einen bestimmten Grenzwert, kann dies durch eine Verringerung des renalen Sauerstoffverbrauchs nicht mehr kompensiert werden und es kommt zu einer Erhöhung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz [345] und folglich zu einer Stimulation der EPO-Synthese. Angaben über die Größe dieses Grenzwertes sind jedoch unterschiedlich. Thaysen et al. (1961) schlugen hierfür eine Verringerung des RBF auf 35-45% des Ausgangswertes vor [345]. Pagel et al. (1988) schließen aufgrund ihrer Ergebnisse, dass ab einer 90%igen Reduktion des RBF die EPO-Produktion maximal stimuliert wird [283]. Somit könnte die in der eigenen Arbeit verwendete 70%ige Reduktion des RBF kein ausreichender Stimulus für die EPO-Sekretion gewesen sein.

Im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen demonstrierten Maxwell et al. (1997), dass die peritubulären Fibroblasten bei Ischämie der Niere das EPO-Gen vermindert exprimieren [239]. Auch in der post-ischämischen Niere konnte nach komplettem experimentellem Verschluss der Nierenarterie EPO-mRNA Werte gemessen werden, die 50-67% niedriger waren als in der kontralateralen Niere [340]. Allerdings bleibt hier zu bemerken, dass sich die genannten Studien im Versuchsaufbau und der Messmethodik deutlich von der eigenen Arbeit unterscheiden. Beispielsweise betrug die Dauer der renalen Hypoperfusion bei den Arbeiten von Cooper und Nocenti (1961) und Cotes und Lowe (1963) nur wenige Stunden [54;57]. In der eigenen Arbeit hingegen erfolgten die Messungen nach 7-tägiger Stenosierung der Nierenarterie. Weiterhin muß beachtet werden, dass diese in-vivo-Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies mit vollständig ligierten Nierenarterien durchgeführt wurden [239;340;247]. Da hierbei für die Nierenfunktion wichtige

Ionengradienten nicht mehr aufrechterhalten werden können, nehmen die Zellen Wasser auf und schwellen an. Begünstigt wird dieser Vorgang durch einen ischämisch bedingten Untergang des Zytoskellets. Es kommt zu einer Kompression der Tubuli, die durch Ablagerungen von Zelltrümmern im Tubulsulumen noch verstärkt wird [36].

Mikroskopische Untersuchungen von Tan et al. (1996) zeigen, dass durch die fehlende Durchblutung der Niere ischämische Einzelzellnekrosen der Tubuluszellen entstehen, woraus eine Störung der Resorption und der exkretorischen Funktion der Niere resultieren [340]. Živný et al. (1972) gehen aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass die ischämische Schädigung des Nierengewebes auch die EPO-produzierenden Fibroblasten betrifft und die Niere deshalb die Fähigkeit verliert, adäquate Mengen EPO zu produzieren [247]. Tan et al. (1996) schreiben den Tubuluszellen eine wichtige Rolle beim Prozess des Sauerstoff-Sensings zu. Sie postulieren, dass die Zerstörung der Tubuli die Sensilität der EPO-produzierenden Fibroblasten gegenüber Änderungen des pO_2 beeinträchtigt [340].

Diesen Ergebnissen stehen jedoch die Arbeiten zahlreicher anderer Autoren gegenüber. Diese Forschungsgruppen konnten in tierexperimentellen Studien eine Steigerung der EPO-Produktion nach Nierenarterienstenosierung beobachten [101;132;260;262;283;284;336]. Auch wurde in klinischen Studien eine leichte, aber doch signifikante Erhöhung der EPO-Produktion bzw. der Erythropoese bei Patienten mit Nierenarterienstenose gefunden [37;355]. In einigen Fällen wurde sogar eine Erythrozytose oder Polyzythämie beobachtet [13;37;162;342]. Ein genauer Mechanismus für die genannten Beobachtungen ist jedoch bis heute nicht bekannt. Man kann nicht eindeutig sagen, ob allein die Senkung des RBF oder die dadurch bedingte renale Hypoxie die beobachteten Effekte verursachen. In diesem Zusammenhang konnten Pavlovic-Kentera et al. (1965) zeigen, dass eine selektive Senkung der renalen Sauerstoffzufuhr durch einen Shunt zwischen rechtem Herzvorhof und Nierenarterie die EPO-Produktion bei Hunden nur in 50% der Fälle moderat zu steigern vermochte [286]. Auch konnte an isoliert hypoxämisch perfundierten

Nieren keine Steigerung der EPO-Sekretion beobachtet werden [85;233]. Im Gegensatz dazu fanden Pagel et al. (1988), dass die Reduktion des RBF, verglichen mit einer Anämie, nur ein schwacher Stimulus für die EPO-Sekretion ist [283]. Da sich in der Niere zahlreiche vasoaktive und inflammatorische Mediatoren befinden, ist folglich nicht auszuschließen, dass die EPO-Sekretion bei renaler Hypoperfusion auch durch diese Mediatoren moduliert wird. Durch die Senkung des renalen Perfusionsdruckes kommt es zur Aktivierung und zu komplexen Interaktionen dieser Substanzen. Unter anderem wird die Nitrid-Oxid(NO)-Produktion gesenkt, dagegen sind die Konzentrationen von Endothelin, Renin, Angiotensin II, Prostaglandin E₂, Prostacyclin I₂, Thromboxan A₂ und TGF-β erhöht [62;169]. Wechselseitige Abhängigkeiten zwischen den genannten Mediatoren und EPO können nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise gilt TGF-β als endogener Antagonist der Erythropoese [52]. Dagegen ist bekannt, dass Renin und ACE auf noch unbekannte Art und Weise die EPO-Sekretion unterstützen [61;287]. Allerdings konnte bisher noch kein direkter Effekt des RAAS auf die EPO-Sekretion bewiesen werden [8;369].

4.2.4 Teil IV: Einfluss der Leber-Arterialisierung auf die CO-stimulierte hepatische EPO-Sekretion

Die Leber ist während der Fetalphase und bei einigen Spezies auch während der frühen Postnatalphase der überwiegende Produktionsort von EPO [77;178]. Anhand verschiedener tierexperimenteller Studien konnte in der fetalen Leber bis zu 95% der Gesamt-EPO-mRNA nachgewiesen werden [60;277;288;370]. Nach der Geburt findet ein Wechsel von überwiegend hepatischer zu überwiegend renaler EPO-Produktion statt. Zeitpunkt und Dauer dieses Wechsels sind speziesspezifisch.

Die Mechanismen, die zu diesem Wechsel führen, sind trotz zahlreicher Hypothesen bislang ungeklärt. Weiterhin ist unklar, warum die Leber nach dem Wechsel zur renalen EPO-Produktion einen Verlust der renalen EPO-Produktion, z.B. beim chronischen Nierenversagen, nicht mehr kompensieren kann [50]. Im Tierexperiment zeigte sich bei nephrektomierten Tieren unter

extremen Blutungen lediglich ein Anstieg der extrarenalen Produktion von 10,3 % auf 15,1% [85].

Da die EPO-Synthese durch Sauerstoffangebot und -verbrauch reguliert wird [177], erscheint ein Einfluss der veränderten Blutversorgung in der fetalen Leber auf die EPO-mRNA-Synthese denkbar: Zum einen ist der Sauerstoffverbrauch in der fetalen Leber sehr gering [39;40], zum anderen wird die fetale Leber im Gegensatz zur adulten Leber mit stärker oxygeniertem Blut versorgt. In der Plazenta arterialisiertes Blut fließt zum Teil mit wenig Pfortaderblut vermischt zur Leber, zum Teil durch den Ductus venosus Arantii an der Leber vorbei in die untere Hohlvene. Durch neuere Ultraschalluntersuchungen konnte gezeigt werden, dass der größere Teil des oxygenierten Umbilikalvenenblutes (79-80%) durch die fetale Leber fließt [201]. Nach Obliteration von Umbilikalvene und Ductus venosus innerhalb der ersten Woche postpartem fließt in der Pfortader zwar nährstoffreiches, jedoch sauerstoffarmes Blut zur Leber.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde untersucht, inwiefern eine Re-Oxygenierung des Pfortaderblutes die EPO-Produktion in der Leber beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die hepatische EPO-mRNA-Expression bei nicht operierten Tieren unter Normoxie etwa 30% der renalen EPO-mRNA-Expression betrug. Die Hypoxie-Exposition stimulierte sowohl die renale als auch die hepatische EPO-mRNA-Expression. Durch milde hypoxische Stimulation konnte die EPO-mRNA-Expression in der Leber 3fach, in der Niere dagegen 20fach gegenüber normoxischen Werten gesteigert werden. Starke hypoxische Stimulation bewirkte eine 28fache Steigerung der EPO-mRNA-Synthese in der Leber und eine 125fache Steigerung in der Niere.

Weiterhin konnte demonstriert werden, dass eine Oxygenierung des Pfortaderblutes die hepatische EPO-mRNA-Expression nicht signifikant beeinflusste. Ebenso wurden keine Unterschiede in der Verteilung der EPO-mRNA zwischen rechtem und linkem Leberlappen gefunden.

Dass die Niere den größten Teil der EPO-Produktion trägt, die Leber jedoch in der Lage ist, ihre EPO-Produktion signifikant zu steigern, konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden [24;34]. Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Tan et al. (1992) gezeigt werden, dass die Leber genauso wie die Niere auf hypoxischen Stimulus mit einer Steigerung der EPO-Synthese reagiert, die Reaktion im Vergleich zur Niere jedoch abgeschwächt ist [338]. Wie schon von Ratcliffe (1993) vorgeschlagen, spricht dies für eine geringere Sensitivität der Leber gegenüber Hypoxie [296]. Dies könnte auch die Tatsache erklären, warum ein Ausfall der renalen EPO-Produktion, z.B. nach subtotaler Nephrektomie oder chronischem Nierenversagen durch die EPO-Synthese in der Leber nicht effektiv kompensiert werden kann [46;339].

Widersprüchlich zu den eigenen Versuchsergebnissen sind die Ergebnisse älterer tierexperimenteller Studien. Hierbei wurde gezeigt, dass die Leber unter Normoxie nur noch 10-20% der gesamten EPO-Serumkonzentration produziert [315;358]. In der eigenen Studie wurde hingegen unter Normoxie eine hepatische m-RNA-Expression gemessen, die 30% der renalen EPO-mRNA-Menge betrug. Diese Beobachtungen könnten mit einer unzureichenden Translation der hepatischen EPO-mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins erklärt werden [179;296]. Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass es bisher nicht gelungen ist, die Bioaktivität des Hormons in der Leber von hypoxischen Tieren nachzuweisen [180].

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss der Pfortader-Arterialisierung auf die hepatische EPO-Produktion gefunden. Die arterialisierte Leber reagiert zwar auf hypoxischen Stimulus mit einer Steigerung der EPO-Produktion, diese unterscheidet sich jedoch nicht von der Steigerung der EPO-Sekretion bei scheinoperierten Kontrolltieren. Die Oxygenierung des Pfortaderblutes wurde nach der Methode von Shimizu et al. (2000) durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe hatte 10 Tage postoperativ im Pfortaderblut eine Sauerstoffsättigung von 94% (vs. 79% bei Kontrolltieren) und einen Sauerstoffpartialdruck von 71mmHg (vs. 45mmHg bei Kontrolltieren) gemessen. In Vorversuchen konnten diese

Resultate bei der eigenen Arbeit reproduziert werden. Weiterhin wurden keine signifikanten Veränderungen des Lebergewichtes und der Histologie beobachtet [320]. Da das fetale Blut der Umbilikalvene nach der Passage durch die Plazenta eine Sauerstoffsättigung von etwa 80% enthält [123], wurde durch die experimentelle Veränderung eine Sauerstoffsättigung des Pfortaderblutes erzielt, die höher war als beim Foetus. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das fetale Hämoglobin (HbF) eine höhere Affinität zu Sauerstoff besitzt als beim adulten Organismus. Weiterhin ist der Sauerstoffverbrauch der fetalen Leber sehr gering. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wird bei der Passage durch die fetale Leber lediglich um 15 % reduziert [39;40]. Um bei dem vorliegenden Versuch auch im perivenösen Bereich der Leberazini einen im Vergleich zu nicht arterialisierten Tieren höheren Sauerstoffpartialdruck zu erzielen, muss die Sauerstoffsättigung des Pfortaderblutes höher sein als beim Foetus.

Obwohl die fetalen Leberlappen nach Untersuchungen von Rudolph et al. unterschiedlich stark durchblutet werden [308], konnte beim Menschen und bei Ratten bisher kein Unterschied in der Verteilung der EPO-mRNA-Expression innerhalb der Leber gefunden werden [60;297]. Diese Aussage kann durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die EPO-mRNA-Expression in rechtem und linkem Leberlappen sowohl unter Normoxie als auch nach hypoxischem Stimulus nicht signifikant unterschiedlich war.

Es ist aber auch denkbar, dass die EPO-produzierenden Hepatozyten bereits in der Postpartalphase durch die verringerte Sauerstoffversorgung der Leber inaktiviert werden: es ist seit kurzem bekannt, dass es unter Hypoxie bei bestimmten Zelllinien zum programmierten Zelltod (Apoptose) kommt [148]. Der programmierte Zelltod beschreibt ein Programm, das aktiv durch zelluläre Faktoren geregelt wird und letztendlich zum Absterben der Zelle führt [193]. Es wurde gezeigt, dass Apoptose eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielt. Das Programm ist dabei am Entfernen überflüssiger Zellen beteiligt [175]. Bisher konnte im Zusammenhang mit dem

Tumorwachstum gezeigt werden, dass HIF-1 α unter Hypoxie über die Aktivierung von Caspasen (Cysteinproteasen mit einem Molekulargewicht von 45 kD) an der Apoptose-Induktion maßgeblich beteiligt ist [148]. HIF-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der EPO-Genexpression. In der Leber werden alle α -Untereinheiten der HIF's exprimiert. HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α -cDNA wird dabei hauptsächlich im perivenösen Bereich des Leberazinus exprimiert [195]. Dort ist der pO₂ im Vergleich zum Periportalgebiet (65mmHg) stark erniedrigt (35mmHg) [188]. Möglicherweise wird durch die postpartale Verringerung der hepatischen Sauerstoffzufuhr die Aktivierung von HIF-1 α induziert. HIF-1 α wiederum könnte über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose EPO-produzierender Hepatozyten bewirken.

Zusammenfassend lässt sich aus obigen Ergebnissen ableiten, dass eine Re-Aktivierung der EPO-produzierenden Hepatozyten durch experimentelle Arterialisierung des Pfortaderblutes nicht möglich ist. Folglich bleibt ungeklärt, warum die Fähigkeit der Leber zur EPO-Produktion nach der Geburt sinkt. Möglicherweise sind die Oxygenierung und der stärkere Druck in den Lebergefäßen kein ausreichender Stimulus für die hepatische EPO-Sekretion.

4.2.5 Teil V: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und EPO-Sekretion

4.2.5.1 Renale sympathische Innervierung und Reninsekretion

Neuronal wird die Reninsekretion über sympathische Einflüsse moduliert. In diesem Zusammenhang ist die wesentlich dichtere Innervation der juxtaglomerulären Zellen mit sympathischen Nervenfasern im Vergleich zu glatten Muskelzellen oder Zellen des extraglomerulären Mesangiums wichtig. Die sympathische Innervierung des juxtaglomerulären Apparates wurde bereits 1973 von Barajas nachgewiesen [16]. Die sympathischen Nervenfasern innervieren ebenso die Tubuli und die Gefäße der Niere [66;68].

Sowohl die Aktivierung der sympathischen Nerven in der Niere als auch zirkulierende oder lokal sezernierte Katecholamine führen über β_1 -

Adrenorezeptoren des juxtaglomerulären Apparates zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Dadurch kommt es zum Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. cAMP stellt wiederum einen wichtigen Stimulator der Reninsekretion dar [159;211]. Konsequenterweise führt also eine renale Denervierung zu einem Abfall der basalen Reninausschüttung [42]. Es werden allerdings nur Zellen zur Reninsekretion angeregt, die eng benachbart zum juxtaglomerulären Apparat liegen [356]. Glatte Muskelzellen, die an anderen Stellen der afferenten Arteriole liegen und Reninvesikel haben, können dadurch nicht zur Sekretion angeregt werden. Ebenso können keine neuen Zellen durch Katecholamine zur Reninproduktion rekrutiert werden [159]. Unklarheit besteht noch immer über die zahlreichen intra- und extrarenalen Interaktionen zwischen renalen Nerven und Renin-Angiotensin-System. Ein wichtiger Ausgangspunkt bei der Erforschung dieser Interaktionen war die Beobachtung, dass intrarenales Angiotensin II die Noradrenalin-Freisetzung an sympathischen Nervenendigungen verstärkt [33;364]. Ebenso konnte durch Gabe von ACE-Inhibitoren bzw. AT₁-Rezeptorantagonisten eine durch renale Nerven vermittelte Antinatriurese vermindert bzw. vollständig blockiert werden [144;145;186]. Auch ist wohl ein großer Anteil der Angiotensin II vermittelten Wirkung von einer intakten renalen Innervation abhängig [67]. Allerdings scheint ein bestimmter Aktivierungsgrad des Renin-Angiotensin-Systems hierfür Voraussetzung zu sein [33;124]. Es muß jedoch angemerkt werden, dass diese Messungen, die zum größten Teil an narkotisierten Tieren durchgeführt worden waren, an wachen Tieren nicht reproduziert werden konnten [250;269]. Beim Menschen wurden diese Zusammenhänge bisher noch nicht untersucht.

Die Rolle der α -Rezeptoren in der Regulation der Reninsekretion ist nicht ganz klar, da überwiegend Hemmung [65], gelegentlich auch Stimulation nach α -Aktivierung beobachtet wurde [139]. Bisher gibt es mehr Hinweise für einen hemmenden α -adrenorezeptorabhängigen Weg in reninsezernierenden Zellen als für einen stimulierenden Effekt. Allerdings steht der Beweis für die Anwesenheit von α -Rezeptoren auf den reninsezernierenden Zellen noch aus [138].

4.2.5.2 Einfluss von renaler Denervierung auf das RAAS

Wie bereits aufgeführt, ist der Einfluss von Hypoxie auf das Renin-Angiotensin-System unzureichend untersucht. Dementsprechend widersprüchlich sind auch die Ergebnisse zur Auswirkung der renalen Denervierung auf die Renin-Sekretion unter Hypoxie. Krämer et al. (1998) und Ritthaler et al. (1997) gehen nach ihren Ergebnissen davon aus, dass die Auswirkung der Hypoxie-Exposition auf die Renin-Sekretion nicht durch renale Nerven vermittelt wird [210;304]. Bei der hier vorliegenden Studie konnte in Übereinstimmung mit den Arbeiten dieser Autoren keine signifikante Veränderung der Renin-Sekretion bei renal denervierten Tieren unter Hypoxie beobachtet werden. Nach Fletcher et al. (1999) und Bunag et al. (1966) hingegen wird eine durch chronische Hypoxie induzierte Steigerung der Renin-Sekretion durch beidseitige Denervierung der Nierenarterie supprimiert [102]. Krämer et al. (1998) vermuten, dass zirkulierende Katecholamine eine Rolle bei Hypoxie-induzierten Veränderungen der Reninsekretion spielen, da bei Ratten nach Hypoxie-Exposition eine um bis zu 3,2fach erhöhte Noradrenalin-Konzentration sowie eine um bis zu 7,8fach erhöhte Adrenalin-Konzentration im Blut gemessen wurde [210]. Dies war in früheren Versuchen auch schon von Gowdy et al. (1966) gezeigt worden [129]. Die Rolle der zirkulierenden Katecholamine bei der Stimulierung der Renin-Sekretion und der Einflussnahme auf die Nierenfunktion ist noch weitgehend unklar: DiBona et al. (1985) konnten feststellen, dass der Effekt zirkulierender Katecholamine auf die Nierenfunktion geringer ist als der renaler Nerven [65].

4.2.5.3 Einfluss von Beta-Adrenozeptoragonisten auf das RAAS

Die Stimulation von β_1 -Rezeptoren bewirkt über Bildung von cAMP bekanntermaßen eine Steigerung der Renin-Sekretion. Die Aktivierung der Renin-Sekretion geschieht durch direkte Interaktion der β -adrenergen Stimuli mit den renin-sezernierenden Zellen des JGA, unabhängig von systemischen oder indirekten renalen Effekten [334]. Auch zirkulierendes Noradrenalin wirkt direkt über β -Rezeptoren der JGA-Zellen. Diese Interaktion kann durch die renalen Nerven nicht beeinflusst werden [6].

Krämer et al. (1998) haben durch Messungen der Renin-mRNA in der Niere unter Hypoxie bewiesen, dass unspezifische β -Adrenozeptoragonisten (Isoproterenol) die Renin-Expression um 130 % zu steigern vermögen. Ist das RAAS durch salzarme Diät bereits aktiviert, kann durch Isoproterenol keine weitere Steigerung der Renin-Sekretion erzielt werden [210].

Die Ergebnisse von Krämer et al. (1998) können durch die Daten der hier vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Allerdings muß beachtet werden, dass der unspezifische β -Adrenozeptoragonist Isoproterenol in der eigenen Arbeit in niedriger (subpressorischer) Dosierung verabreicht worden ist. Ein Einfluß auf das RAAS ist somit unwahrscheinlich.

4.2.5.4 Einfluss von Beta-Adrenozeptorantagonisten auf das RAAS

Bereits mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass die Renin-Sekretion durch renale Denervierung oder β -Adrenozeptorantagonisten supprimiert werden kann [351]. In der hier vorliegenden Studie konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. Es muß allerdings beachtet werden, dass die Messung direkter Effekte der β -Adrenozeptorantagonisten auf die Renin-Sekretion aufgrund zahlreicher systemischer Effekte erschwert ist. Auch kann durch β -Blockade nur ein bereits aktiviertes RAAS im Sinne einer Supprimierung beeinflusst werden. Die basale Reninsekretion wird durch β -Adrenozeptorantagonisten nicht modifiziert [167].

4.2.5.5 Einfluss von Neuropeptid Y (NPY) auf das RAAS

Neuropeptid Y findet sich in besonders hohen Konzentrationen in zentralen und peripheren Neuronen, also auch in adrenergen Neuronen des peripheren sympathischen Nervensystems. Es wird zusammen mit Noradrenalin in synaptischen Vesikeln gespeichert und unter Aktivierung des Sympathikus freigesetzt. Die reninproduzierenden juxtaglomerulären Zellen werden durch das sympathische Nervensystem innerviert und die sympathischen Nervenendigungen werden in enger Nachbarschaft zu den juxtaglomerulären Zellen gefunden. In diesem Zusammenhang interessiert die Beeinflussung der

Nierenfunktion und insbesondere des RAAS durch Neuropeptid Y. Dass neben Noradrenalin auch weitere Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems die Renin-Sekretion beeinflussen, konnte bereits gezeigt werden. So wiesen Ganong et al. (1984) nach, dass serotonerge Neurone im Nucleus raphé dorsalis die Renin-Sekretion über psychosoziale Stimuli regulieren, Substanz P hingegen inhibiert die Renin-Sekretion [116]. Daten über die Wirkungsweise von Neuropeptid Y auf die Renin-Sekretion sind jedoch rar. Haefliger et al. (1999) stellten fest, dass es nach Senkung des renalen Perfusionsdruckes es zu einer Supprimierung der NPY-mRNA in den Tubuli kam. Ferner vermuten die Autoren aufgrund ihrer Ergebnisse, dass zirkulierendes Angiotensin II an der Regulation der NPY-Sekretion beteiligt ist. Der systemische Blutdruck scheint keinen Einfluß auf die Synthese von Neuropeptid Y zu haben [140]. Auch konnten Grouzmann et al. (1994) nachweisen, dass das RAAS die Sekretion von NPY und Katecholaminen bei Patienten mit Phäochromozytom zu steigern vermag und an der Triggerung einer hypertensiven Krise beteiligt ist [134]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sprechen jedoch deutlich gegen eine Interaktion von NPY und RAAS. Es muß aber auch hier berücksichtigt werden, dass NPY in suppressorischer Dosierung verabreicht [32] wurde, um indirekte Wirkungen auf die EPO-Sekretion zu vermeiden.

4.2.5.6 Verminderte renale Gewebemenge und RAAS

Den Hauptanteil der Renin-Synthese tragen die Nieren. Dort wird Renin in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen als Preprorenin transkribiert und translatiert. Konsequenterweise müsste ein Verlust von Nierenmasse zu einer Reduktion der renalen Renin-Synthese führen. Forschungsergebnisse hierzu sind jedoch widersprüchlich. In der hier vorliegenden Studie wurde nach unilateraler Nephrektomie keine Veränderung der PRA beobachtet. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den von El-Dahr et al. (1990) und Tank et al. (1996) erhobenen Daten. Diese Autoren schlossen aufgrund ihrer Messungen eine Veränderung der PRA durch einseitige Nephrektomie aus [81;341]. Im Gegensatz dazu fanden Kato et al. (1997) eine verminderte PRA nach einseitiger Nephrektomie und kontralateraler Nierenarterienstenose [191]. Zusätzlich ist die Reaktion der

kontralateralen Niere auf die einseitige Nephrektomie zu bedenken. El-Dahr et al. (1990) konnten ein Absinken des Renin-Gehaltes in der kontralateralen Niere nachweisen [81]. Messungen von Valentin et al. (1994) und Correa-Rotter et al. (1992) hingegen ergaben, dass Angiotensin-mRNA und Renin-mRNA der kontralateralen Niere unverändert bleiben. Da sich nach einseitiger Nephrektomie das Nierengewicht der kontralateralen Niere erhöht, schlossen die Autoren daraus, dass Angiotensin nicht an der Hypertrophie der kontralateralen Niere beteiligt ist [55;352]. Es gibt gute Hinweise, dass sich die Menge der Renin-Synthese in der kontralateralen Niere im zeitlichen Verlauf ändert und darüberhinaus vom bereits bestehenden Aktivierungszustand des RAAS abhängig ist [208;325;341].

Für das Modell der subtotalen Nephrektomie konnte in der eigenen Arbeit eine signifikante Supprimierung der PRA gezeigt werden. Gestützt wird dieses Ergebnis durch Messungen von Pupilli et al. (1992) [292]. Diese Autoren konnten unter normoxischen Versuchsbedingungen eine Senkung von Renin-mRNA in der Restniere sowie eine Senkung der PRA bei subtotal nephrektomierten Tieren nachweisen. Diesen Effekt konnten Correa-Rotter et al. (1992) und Ibrahim et al. (1998) nicht beobachten. Sie fanden im Gegenteil im infarzierten Gebiet der Restniere eine signifikant erhöhte Renin-mRNA. Aufgrund dieser Tatsache schließen die Autoren, dass Renin eine pathophysiologische Rolle beim progressiven Nierenversagen spielt. Im nichtinfarzierten Nierengewebe waren Renin-mRNA und Angiotensin-mRNA unverändert [55;166].

Nach Verlust von Nierengewebe kommt es üblicherweise zu einer kompensatorischen Hypertrophie des verbleibenden Nierengewebes. Ferner werden bei chronischer Stimulation in den afferenten Arteriolen zusätzlich glatte Muskelzellen in reninproduzierende Zellen umgewandelt [14;343]. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen scheint die Restniere jedoch nicht in der Lage zu sein, die Reninsynthese zu steigern. Untersuchungen zur Reninsyntheseleistung bei subtotaler Nephrektomie unter hypoxischen

Bedingungen sind noch nicht durchgeführt worden, und man kann daher nur spekulieren, ob die Hypoxie-Exposition bei der Supprimierung der Reninsynthese eine Rolle spielt.

4.2.5.7 Einfluss der akuten Ureterligatur auf das RAAS

Es ist bekannt, dass eine akute oder chronische Ureterobstruktion weitreichende Wirkungen auf die Nierenfunktion und Hämodynamik hat. Hierzu gehören eine Erhöhung des systemischen Blutdruckes, die Induktion einer tubulo-interstitiellen Fibrose durch Infiltration von Makrophagen und Monozyten [265] sowie die Verringerung der renalen Masse, die Hypertrophie der kontralateralen Niere [89], die Tubulusatrophie und eine verlängerte Vasokonstriktion [11]. Die Beteiligung des RAAS an diesen Veränderungen wurde in zahlreichen Forschungsarbeiten nachgewiesen. Von den meisten Autoren wird angenommen, dass eine Erhöhung von Angiotensin II in der Niere für die postobstruktiven Veränderungen der Nierenfunktion verantwortlich ist [11;89;152;265;366]. Diese Theorie konnte allerdings durch die Ergebnisse der eigenen Studie nicht unterstützt werden. Nach akuter Ureterobstruktion wurde in der vorliegenden Studie keine signifikante Veränderung der PRA unter Hypoxie gemessen. Ähnliche Ergebnisse waren zuvor von el-Dahr et al. (1990) erzielt worden [81]. Allerdings konnte diese Arbeitsgruppe in der kontralateralen Niere eine Supprimierung des RAAS beobachten. Auf diese Weise könnte der erwähnte Widerspruch zu früheren Arbeiten erklärt werden.

Unklar bleibt weiterhin, welche Mediatoren bei den postobstruktiven Veränderungen in der Niere eine Rolle spielen. Yarger et al (1980) vermuten eine Beteiligung von Prostaglandinen und Thromboxanen [366]. Nakatani et al. (2002) schließen aus ihren Ergebnissen, dass Angiotensin II durch Erhöhung des oxidativen Stress und NF- κ B-Suppression wirkt [265]. Die renalen Nerven und der systemische Blutdruck scheinen bei der Angiotensin II-Aktivierung durch Ureterobstruktion keine Bedeutung zu haben [89;273].

4.2.5.8 Nierenarterienstenosierung und RAAS

Der renale Perfusionsdruck ist ein starker Regulator der Reninsynthese und Reninsekretion. Da diese druckabhängige Regulation auch in der isolierten perfundierten Niere erhalten bleibt, muss der dafür verantwortliche Drucksensor in der Niere selbst lokalisiert sein [314]. Die Lokalisation und Funktionsweise dieses Barorezeptors ist bis jetzt nicht genau identifiziert, jedoch scheint es sich nach bisherigen Überlegungen um einen Dehnungsrezeptor auf den reninsezernierenden Zellen zu handeln, der die Wandspannung der afferenten Arteriole misst [103;349].

Dass die Reninsekretion invers mit dem renalen Perfusionsdruck verknüpft ist, wurde mehrfach durch experimentelle Senkung des renalen Perfusionsdruckes bewiesen. So konnte nach Anbringen eines Nierenclips (Goldblatt) ein Anstieg von PRA, Renin-mRNA und Angiotensin I-Konzentration in der Niere gemessen werden [140;234;237;350]. Dabei erhöht sich die PRA unmittelbar, der Renin-mRNA-Anstieg folgt erst nach 1-2 Tagen. In der kontralateralen Niere kommt es nach Steigerung des renalen Perfusionsdruckes zu einer 50%igen Senkung der Renin-mRNA [234]. Eine Erhöhung der Renin-Sekretion zeigte sich nicht unter hypoxischen Bedingungen [237]. In der vorliegenden Studie wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Martin et al. (1994) [237] unter hypoxischen Versuchsbedingungen keine signifikante Veränderung der PRA nach Nierenarterienstenosierung beobachtet, wenngleich die PRA bei Nierenarterienstenosierung leicht erhöht war. Verantwortlich für die beobachteten Effekte könnten Veränderungen des systemischen Blutdruckes und des Natriumgleichgewichtes unter Hypoxie sein. Es gibt bereits mehrere Hinweise dafür, dass akute Hypoxie eine Verminderung der tubulären Natriumreabsorption bewirkt [176;280;332]. Über den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus besteht eine funktionelle Beziehung zwischen der Elektrolytzusammensetzung der tubulären Flüssigkeit an der Macula densa und der Reninsekretionsrate [125;227]. Folglich könnte ein Hypoxie-induzierter Anstieg der tubulären NaCl-Konzentration an der Macula-densa zu einer Abnahme der Reninsekretion führen und den stimulatorischen Effekt der Nierenarterienstenosierung auf die reninsezernierenden Zellen überdecken.

Auch über die Beteiligung der renalen Nerven an der druckabhängigen Regulation der Renin-Sekretion besteht Unklarheit. Villareal et al. (1984) konnten nachweisen, dass eine renale Denervierung keinen Einfluss auf eine systemische Blutdruckerhöhung bei Nierenarterienclip (Goldblatt) hat. Die Autoren schlossen daraus, dass die renalen Nerven nicht an der druckabhängigen Regulation der Reninsynthese beteiligt sind. Neuere Studien konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen [354]. Wagner et al. (1999) fanden, dass PRA und Renin-mRNA nach renaler Denervierung und reduziertem Nierenperusionsdruck signifikant reduziert waren [356].

4.2.5.9 Einfluss der Pfortader-Oxygenierung auf das lokale RAAS der Leber

Den größten Teil der Renin-Sekretion tragen die Nieren. Zwar sinkt die PRA nach beidseitiger Nephrektomie auf nicht mehr messbare Werte [35], jedoch konnte durch die Detektion von Renin-mRNA in unterschiedlichen Organen bewiesen werden, dass das RAAS in einer Vielzahl von Geweben vorkommt. Darunter befinden sich neben der Niere auch Nebennieren, Blutgefäßen, Gehirn, Spinalkanal, Mesenterium, Lunge und Milz [44]. Hierbei handelt es sich sozusagen um ein lokales RAAS, das wahrscheinlich unabhängig vom endokrinen System ist [28;244]. Dieses gewebespezifische RAAS scheint Einwirkung auf die Gewebefunktion zu haben, ist jedoch nicht an der Regulation des systemischen Blutdruckes beteiligt [35]. Vor allem lokal sezerniertes Angiotensin II beeinflusst das Zellwachstum, die Zell-Apoptose, die Herstellung reaktiver Sauerstoffspezies, die Sekretion von Botenstoffen, Entzündungsreaktionen und die Kollagensynthese [220]. Auch die Leber hat die Möglichkeit, sämtliche Komponenten des RAAS selbst zu synthetisieren. Darüber hinaus trägt die Leber neben der Niere den Hauptanteil des Renin-Abbaus [198]. Daten über die Regulation des lokalen RAAS in der Leber sind jedoch rar. Bisher konnte eine Erhöhung des lokalen RAAS bei Patienten mit Leberzirrhose nachgewiesen werden [371]. Es wird vermutet, dass das lokale RAAS hierbei für den erhöhten Widerstand der Pfortader verantwortlich ist. Auch kann das gewebespezifische RAAS der Leber durch Thyroxin,

Angiotensin II, Dexamethason und Östradiol zur Synthesesteigerung aktiviert werden [171;242].

Obwohl es Hinweise für eine Beeinflussung des lokalen RAAS der Leber durch eine verminderte Blutversorgung durch die Pfortader gibt [137], konnte in der vorliegenden Arbeit nach Anlage eines hepatorenen Shunts keine Veränderung der PRA beobachtet werden. Die eigenen Ergebnisse legen somit für dieses Modell nahe, dass die Reninsynthese in der Leber weitgehend unabhängig vom Oxygenierungsgrad des Pfortaderblutes ist. Diese Theorie kann durch eine ältere Studie von Kokot et al. (1986) gestützt werden. Diese Autoren fanden im Einklang mit den eigenen Ergebnissen nach kurzzeitiger Arterialisierung des Pfortaderblutes keine Veränderung der PRA, konnten nach chronischer Arterialisierung der Pfortader (3-8 Monate) jedoch einen Anstieg der PRA messen [207]. Es erscheint somit denkbar, dass die hepatische Durchblutung an der Regulation des gewebespezifischen RAAS beteiligt ist, hierbei jedoch eine Zeitabhängigkeit besteht. In diesem Zusammenhang konnten Sonkodi et al. (1983) an In-vivo-Experimenten zeigen, dass akute experimentelle Reduktion der hepatischen Durchblutung die PRA steigert. Eine chronische Reduktion der Leberdurchblutung vermochte die PRA hingegen nicht zu verändern [326].

4.3 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie weisen daraufhin, dass die renalen Nerven unter milder Hypoxie einen wesentlichen Faktor für die Regulation der EPO-Sekretion in der Niere darstellen. Neuropeptid Y und β -adrenerge Rezeptoren scheinen als Mediatoren an der Steuerung der EPO-Sekretion durch die renalen Nerven beteiligt zu sein. Epozyten können in der Niere den Verlust von Nierengewebe nur bis zu einem gewissen Grad kompensieren. Eine Senkung der renalen Sauerstoffzufuhr führt zur Steigerung der EPO-Produktion. Die Senkung des renalen Sauerstoffverbrauchs durch eine akute Ureterligatur beeinflusst die EPO-Synthese nicht. Chronische Harnstauung führt möglicherweise, bedingt durch einen Funktionsverlust der Epozyten, zu einer Supprimierung der EPO-

Produktion. Eine vermehrte Oxygenierung des Pfortaderblutes stellt keinen wesentlichen Stimulus für die hepatische EPO-Sekretion dar.

Die PRA wurde durch renale Denervierung, unselektive Adrenozeptoragonisten und Antagonisten sowie durch NPY nicht beeinflusst. Ebenso wenig veränderten renale Hypoperfusion oder akute Harnstauung die Aktivität des RAAS. Im Gegensatz zur unilateralen Nephrektomie konnte für das Modell der subtotalen Nephrektomie eine signifikante Supprimierung der PRA gezeigt werden. Ein Einfluß der Pfortader-Arterialisierung auf die PRA wurde nicht beobachtet.

5 Zusammenfassung

Die Synthese des Glykoproteins Erythropoetin (EPO) korreliert invers mit dem Sauerstoffangebot des arteriellen Blutes und kann unter Hypoxie bis zu tausendfach ansteigen. Die quantitativ relevanten Produktionsorte des Hormons sind die Nieren und zu einem geringeren Anteil die Leber. Es ist bekannt, dass Erythropoetin unter Hypoxie durch Hypoxie-induzierbare-Faktoren (HIF) hochreguliert wird. Bislang ist jedoch ungeklärt, ob andere Mechanismen eine Rolle bei der renalen EPO-Produktion und -Sekretion unter Hypoxie spielen.

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit wurde untersucht, ob die renale Innervation an der Regulation der EPO-Synthese beteiligt ist. Weiterhin wurde geprüft, inwiefern Änderungen der renalen Durchblutung und Gewebemenge die EPO-Sekretion in der Niere modulieren. Der Einfluss einer vermehrten hepatischen Sauerstoffzufuhr auf die EPO-mRNA-Expression in der Leber wurde ebenfalls untersucht. Alle Versuche wurden in einem Modell kohlenmonoxid-induzierter Hypoxie an nicht narkotisierten männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Hierzu wurde eine Dosis-Wirkungskurve der EPO-Spiegel im Serum, bezogen auf CO-Konzentrationen zwischen 0,00 und 0,14 Vol % CO, erstellt.

Die renale Denervierung bewirkte eine Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve mit signifikant erhöhter EPO-Serumkonzentration bei 0,06 Vol % CO. Durch Gabe von NPY konnte die gesteigerte EPO-Sekretion denervierter Tiere signifikant gesenkt werden. NPY-Antagonisten in renal innervierten Tieren führten zu einer Steigerung der EPO-Serumkonzentration allerdings nicht signifikant. β -adrenerge Blockade in renal innervierten Tieren oder β -adrenerge Stimulation in renal denervierten Tieren veränderten die EPO-Serumkonzentration nur geringfügig.

Die Reduktion der renalen Gewebemasse durch einseitige/subtotale Nephrektomie vermochte die EPO-Serumkonzentration und die EPO-mRNA-

Expression unter starkem hypoxischen Stimulus im Nierengewebe signifikant zu senken. Die EPO-mRNA-Menge in der Niere betrug bei starkem hypoxischem Stimulus 33% (einseitige Nephrektomie) bzw. 25% (subtotale Nephrektomie) der EPO-mRNA von Kontrollnieren. Unter milder Hypoxie (bis 0,08 Vol % CO) konnte der Verlust von Nierenparenchym durch die Restniere noch kompensiert werden.

EPO-Serumkonzentration und EPO-mRNA-Gehalt bei Tieren mit akuter Ureterligatur waren nach CO-Exposition signifikant erhöht. Nach chronischer Ligatur wurde bei 0,06 Vol % CO eine signifikante Verringerung der EPO-Serumkonzentration und des EPO-mRNA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Eine 70%ige Stenosierung der Nierenarterie vermochte die EPO-Serumkonzentration sowie die EPO-mRNA in der Restniere unter verschiedenen hypoxischen Stimuli nicht zu verändern.

Die EPO-Synthese in der Leber ließ sich durch starke hypoxische Stimulation bei Kontrolltieren um bis zu 28fach steigern. Die hepatische EPO-mRNA-Expression betrug unter Normoxie etwa 30% der renalen EPO-mRNA-Expression. Nach milder hypoxischer Stimulation (0,05 Vol % CO) lag der EPO-mRNA-Gehalt in der Leber bei 4% des renalen EPO-mRNA-Gehaltes, nach starker hypoxischer Stimulation (0,09 Vol % CO) bei 7%. Eine Oxygenierung des Pfortaderblutes vermochte die hepatische EPO-mRNA-Expression nicht zu verändern.

Ein Einfluss der renalen Denervierung, unselektiven Adrenozeptoragonisten und Antagonisten sowie von NPY auf die PRA wurde nicht beobachtet. Ebenso wenig veränderten renale Hypoperfusion oder akute Harnstauung die Aktivität des RAAS. Nur für das Modell der subtotalen Nephrektomie konnte eine signifikante Supprimierung der PRA gezeigt werden. Ein Einfluß der Pfortader-Arterialisierung auf die PRA fand sich nicht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das renale Nervensystem eine entscheidende Rolle bei der Regulation der EPO-Sekretion spielt. NPY übt über die renalen Nerven eine tonische Hemmung auf die EPO-Produktion aus. Nach Entfernung

von renaler Gewebemasse kann die Niere bis 0,08 Vol % CO die EPO-Produktion kompensieren. Bei stärkeren hypoxischen Stimuli sinkt die EPO-Synthese. Desweiteren zeigte sich, dass die EPO-Produktion bei renaler Hypoperfusion nach Stenose der A. renalis nicht verändert wird. Die erhöhte EPO-Produktion nach akuter Ureterligatur lässt vermuten, dass es hierbei durch den gesteigerten RBF und folglich erhöhter tubulärer Reabsorptionsarbeit zu einer verstärkten Hypoxie mit vermehrter Stimulation der EPO-produzierenden Zellen kommt. Dagegen führt eine chronische Ureterligatur zu einer Supprimierung der EPO-Produktion. Es bleibt unklar, ob hierfür der Funktionsverlust der EPO-produzierenden Zellen oder ein verminderter O₂-Verbrauch der proximalen Tubuli verantwortlich ist. Die Antwort der Leber auf hypoxischen Stimulus erscheint unabhängig vom Sauerstoffgehalt des Pfortaderblutes. Eine Reaktivierung EPO-produzierender Hepatozyten scheint somit nicht möglich zu sein. Wahrscheinlich kommt es bereits postpartal zur Apoptose dieser Zellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Roche Lexikon Medizin, ed 5. Auflage. 2003.
2. Abbrecht PH, Vander AJ, Turcotte JG: Effects of saline loading on the renin, erythropoietin, and blood pressure responses to canine renal allotransplantation. *Circ.Res.* 1969;25:99-105.
3. Acker H: PO₂ chemoreception in arterial chemoreceptors. *Annu.Rev.Physiol* 1989;51:835-844.
4. Acker H, Xue D: Mechanism of O₂ sensing in the carotid body in comparison with other O₂-sensing cells. *News Physiol Sci.* 1995;10:216.
5. Adams JD, Erickson HH, Stone HL: Myocardial metabolism during exposure to carbon monoxide in the conscious dog. *J.Appl.Physiol* 1973;34:238-242.
6. Almgard LE, Ljungqvist A: Effect of circulating norepinephrine on the renin release from the denervated kidney. *Scand.J.Urol.Nephrol.* 1975;9:125-128.
7. Anagnostou A, Baranowski R, Pillay VK, Kurtzman N, Vercellotti G, Fried W: Effect of renin on extrarenal erythropoietin production. *J.Lab Clin.Med* 1976;88:707-715.
8. Andersen ME, Clewell HJ, III, Gargas ML, MacNaughton MG, Reitz RH, Nolan RJ, McKenna MJ: Physiologically based pharmacokinetic modeling with dichloromethane, its metabolite, carbon monoxide, and blood carboxyhemoglobin in rats and humans. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1991;108:14-27.
9. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM: Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J.Clin.Invest* 1985;76:612-619.
10. Aubert JF, Walker P, Grouzmann E, Nussberger J, Brunner HR, Waeber B: Inhibitory effect of neuropeptide Y on stimulated renin secretion of awake rats. *Clin.Exp Pharmacol.Physiol* 1992;19:223-228.
11. Ayan S, Roth JA, Freeman MR, Bride SH, Peters CA: Partial ureteral obstruction dysregulates the renal renin-angiotensin system in the fetal sheep kidney. *Urology* 2001;58:301-306.
12. Ayres SM, Giannelli S Jr, Mueller H, Criscitiello A: Myocardial and systemic vascular responses to low concentration of carboxyhemoglobin. *Ann.Clin.Lab Sci.* 1973;3:440-447.

13. Bacon BR, Rothman SA, Ricanati ES, Rashad FA: Renal artery stenosis with erythrocytosis after renal transplantation. *Arch.Intern.Med.* 1980;140:1206-1211.
14. Barajas L: Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am.J.Physiol* 1979;237:F333-F343.
15. Barajas L, Liu L, Powers K: Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1992;70:735-749.
16. Barajas L, Muller J: The innervation of the juxtaglomerular apparatus and surrounding tubules: a quantitative analysis by serial section electron microscopy. *J.Ultrastruct.Res.* 1973;43:107-132.
17. Bartels H: Comparative Physiology of Oxygen Transport in mammals. *Lancet* 1964;18:601-604.
18. Behrman RE, Lees MH, Peterson EN, De Lannoy CW, Seeds AE: Distribution of the circulation in the normal and asphyxiated fetal primate. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1970;108:956-969.
19. Bellizzi V, Sabbatini M, Fuiano G, Sansone G, Magri P, Uccello F, Andreucci M, De Nicola L, Cianciaruso B: The impact of early normalization of haematocrit by erythropoietin on renal damage in the remnant kidney model. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1998;13:2210-2215.
20. Bello-Reuss E, Colindres RE, Pastoriza-Munoz E, Mueller RA, Gottschalk CW: Effects of acute unilateral renal denervation in the rat. *J.Clin.Invest* 1975;56:208-217.
21. Bellotti M, Pennati G, De Gasperi C, Battaglia FC, Ferrazzi E: Role of ductus venosus in distribution of umbilical blood flow in human fetuses during second half of pregnancy. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;279:H1256-H1263.
22. Berglund B, Sundgot-Borgen J, Wide L: Effect of salbutamol, a beta-2-adrenergic agonist, on erythropoietin concentration in healthy males. *Scand.J.Med.Sci.Sports* 2002;12:31-33.
23. Bernard C: Lecons sur les propri,t, physiologiques et les alt,rations pathologiques des liquides d'organisme. Paris: BailliŠre et fils 1859;2:170-171.
24. Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E: Expression of the erythropoietin gene. *Mol.Cell Biol.* 1986;6:2571-2575.
25. Beynon G: The influence of the autonomic nervous system in the control of erythropoietin secretion in the hypoxic rat. *J.Physiol* 1977;266:347-360.

26. Beynon GW, Balfour WE: The carotid body and erythropoiesis in the rat. *Nature, Lond.* 1973;243:61-62.
27. Bickar D, Bonaventura C, Bonaventura J: Carbon monoxide-driven reduction of ferric heme and heme proteins. *J.Biol.Chem.* 1984;259:10777-10783.
28. Bing J, Poulsen K: Aggression-provoked renin release from extrarenal and extrasubmaxillary sources in mice. *Acta Physiol Scand.* 1979;107:251-256.
29. Bischoff A, Avramidis P, Erdbrugger W, Munter K, Michel MC: Receptor subtypes Y1 and Y5 are involved in the renal effects of neuropeptide Y. *Br.J.Pharmacol.* 1997;120:1335-1343.
30. Bischoff A, Erdbrugger W, Smits J, Michel MC: Neuropeptide Y-enhanced diuresis and natriuresis in anaesthetized rats is independent of renal blood flow reduction. *J.Physiol* 1996;495 (Pt 2):525-534.
31. Bischoff A, Michel MC: Renal effects of neuropeptide Y. *Pflugers Arch.* 1998;435:443-453.
32. Bischoff A, Stickan-Verfurth M, Michel MC: Renovascular and tubular effects of neuropeptide Y are discriminated by PP56 (D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate) in anaesthetized rats. *Pflugers Arch.* 1997;434:57-62.
33. Boke T, Malik KU: Enhancement by locally generated angiotensin II of release of the adrenergic transmitter in the isolated rat kidney. *J.Pharmacol.Exp Ther.* 1983;226:900-907.
34. Bondurant MC, Koury MJ: Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol.Cell Biol.* 1986;6:2731-2733.
35. Bonnet JM, Boivin R, Bernard N, Sassard J: Extrarenal renin-angiotensin systems are unable to maintain blood pressure in sheep. *Clin.Exp Pharmacol.Physiol* 2000;27:684-689.
36. Bonventre JV: Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1993;43:1160-1178.
37. Bourgoignie JJ, Gallagher NI, Perry HM, Jr., Kurz L, Warnecke MA, Donati RM: Renin and erythropoietin in normotensive and in hypertensive patients. *J.Lab Clin.Med.* 1968;71:523-536.
38. Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH: Renal ischemia: a new perspective. *Kidney Int.* 1984;26:375-383.

39. Bristow J, Rudolph AM, Itskovitz J: A preparation for studying liver blood flow, oxygen consumption, and metabolism in the fetal lamb in utero. *J.Dev.Physiol* 1981;3:255-266.
40. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB: Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N.Engl.J.Med.* 1982;307:205-211.
41. Buckler KJ: A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *J.Physiol* 1997;498 (Pt 3):649-662.
42. Bunag RD, Page IH, McCubbin JW: Neural stimulation of release of renin. *Circ.Res.* 1966;19:851-858.
43. Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH: Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch.* 2001;443:240-249.
44. Campbell DJ, Habener JF: Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J.Clin.Invest* 1986;78:31-39.
45. Carnot P, Deflandre C: Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* 1906;143:432-435.
46. Caro J, Brown S, Miller O, Murray T, Erslev AJ: Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J.Lab Clin.Med* 1979;93:449-458.
47. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L: Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol.Cell Biol.* 2000;20:402-415.
48. Chandel NS, Schumacker PT: Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J.Appl.Physiol* 2000;88:1880-1889.
49. Chandra M, Clemons GK, McVicar MI: Relation of serum erythropoietin levels to renal excretory function: evidence for lowered set point for erythropoietin production in chronic renal failure. *J.Pediatr.* 1988;113:1015-1021.
50. Chandra M, Miller ME, Garcia JF, Mossey RT, McVicar M: Serum immunoreactive erythropoietin levels in patients with polycystic kidney disease as compared with other hemodialysis patients. *Nephron* 1985;39:26-29.
51. Chevendra V, Weaver LC: Distributions of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide and somatostatin in populations of postganglionic

- neurons innervating the rat kidney, spleen and intestine. *Neuroscience* 1992;50:727-743.
52. Chuncharunee S, Carter CD, Studtmann KE, Caro J, Coffey RJ, Dessypris EN: Chronic administration of transforming growth factor-beta suppresses erythropoietin-dependent erythropoiesis and induces tumour necrosis factor in vivo. *Br.J.Haematol.* 1993;84:374-380.
 53. Coceani F, Olley PM: The control of cardiovascular shunts in the fetal and perinatal period. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1988;66:1129-1134.
 54. Cooper GW, Nocenti MR: Unilateral renal ischemia and erythropoietin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1961;108:546-549.
 55. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Manivel JC, Rosenberg ME: Renin expression in renal ablation. *Hypertension* 1992;20:483-490.
 56. Cotes PM, Brozovic B: Diurnal variation of serum immunoreactive erythropoietin in a normal subject. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 1982;17:419-422.
 57. Cotes PM, Lowe RD: The influence of renal ischemia on red-cell formation; in: Williams PC (ed): *Hormones and the Kidney*. New York, Academic Press pp 187-194.
 58. Cross AR, Curnutte JT: The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J.Biol.Chem.* 1995;270:6543-6548.
 59. Cross AR, Henderson L, Jones OT, Delpiano MA, Hentschel J, Acker H: Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO₂ sensor protein in the rat carotid body. *Biochem J.* 1990;272:743-747.
 60. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J: Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998;92:3218-3225.
 61. Danovitch GM, Jamgotchian NJ, Eggena PH, Paul W, Barrett JD, Wilkinson A, Lee DB: Angiotensin-converting enzyme inhibition in the treatment of renal transplant erythrocytosis. Clinical experience and observation of mechanism. *Transplantation* 1995;60:132-137.
 62. De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB: Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J.Clin.Invest* 1992;89:1248-1256.
 63. Deen WM, Maddox DA, Robertson CR, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. VII. Response to reduced renal mass. *Am.J.Physiol* 1974;227:556-562.

64. Deetjen P, Kramer K: [The relation of O₂ consumption by the kidney to Na re-resorption]. *Pflugers Arch.Gesamte Physiol Menschen.Tiere.* 1961;273:636-650.
65. DiBona GF: Neurogenic regulation of renal tubular sodium reabsorption. *Am.J.Physiol* 1977;233:F73-F81.
66. DiBona GF: Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000;36:1083-1088.
67. DiBona GF: Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2001;940:395-406.
68. DiBona GF, Kopp UC: Neural control of renal function. *Physiol Rev.* 1997;77:75-197.
69. DiBona GF, Sawin LL: Renal nerves in renal adaptation to dietary sodium restriction. *Am.J.Physiol* 1983;245:F322-F328.
70. Dietrich MS, Fretschner M, Nobiling R, Persson PB, Steinhausen M: Renovascular effects of neuropeptide-Y in the split hydronephrotic rat kidney: non-uniform pattern of vascular reactivity. *J.Physiol* 1991;444:303-315.
71. Dillingham MA, Anderson RJ: Mechanism of neuropeptide Y inhibition of vasopressin action in rat cortical collecting tubule. *Am.J.Physiol* 1989;256:F408-F413.
72. Dinkelaar RB, Hart AA, Engels EY, Schoemaker LP, Chamuleau RA, Bosch E: Metabolic studies of erythropoietin (Ep): I. A reliable micro assay method for Ep in rat plasma using fetal mouse liver cells (FMLC). *Exp.Hematol.* 1981;9:788-795.
73. Donati RM, Bourgoignie JJ, Kuhn C, Gallagher NI, Perry HM, Jr.: Dissociation of circulating renin and erythropoietin in rats. *Circ.Res.* 1968;22:91-95.
74. Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C: Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J.Appl.Physiol* 1989;66:1785-1788.
75. Eckardt KU, Kurtz A, Bauer C: Regulation of erythropoietin production is related to proximal tubular function. *Am.J.Physiol* 1989;256:F942-F947.
76. Eckardt KU, LeHir M, Tan CC, Ratcliffe PJ, Kaissling B, Kurtz A: Renal innervation plays no role in oxygen-dependent control of erythropoietin mRNA levels. *Am.J.Physiol* 1992;263:F925-F930.

77. Eckardt KU, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Kurtz A: Oxygen-dependent expression of the erythropoietin gene in rat hepatocytes in vitro. *Pflugers Arch.* 1993;423:356-364.
78. Edelstone DI: Regulation of blood flow through the ductus venosus. *J.Dev.Physiol* 1980;2:219-238.
79. Edelstone DI, Rudolph AM, Heymann MA: Liver and ductus venosus blood flows in fetal lambs in utero. *Circ.Res.* 1978;42:426-433.
80. Eide I, Loyning E, Langard O, Kiil F: Mechanism of renin release during acute ureteral constriction in dogs. *Circ.Res.* 1977;40:293-299.
81. el Dahr SS, Gomez RA, Gray MS, Peach MJ, Carey RM, Chevalier RL: In situ localization of renin and its mRNA in neonatal ureteral obstruction. *Am.J.Physiol* 1990;258:F854-F862.
82. Emery JL: Functional assymetry of the liver. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1963;111:37-44.
83. Emmanouel DS, Goldwasser E, Katz AI: Metabolism of pure human erythropoietin in the rat. *Am.J.Physiol* 1984;247:F168-F176.
84. Epstein FH, Silva P, Spokes K, Brezis M, Rosen S: Renal medullary Na-K-ATPase and hypoxic injury in perfused rat kidneys. *Kidney Int.* 1989;36:768-772.
85. Erslev AJ, Caro J, Kansu E, Silver R: Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br.J.Haematol.* 1980;45:65-72.
86. Fandrey J, Bunn HF: In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1993;81:617-623.
87. Fandrey J, Frede S, Ehleben W, Porwol T, Acker H, Jelkmann W: Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species. *Kidney Int.* 1997;51:492-496.
88. Feldman DL, Mogelesky TC, Chou M, Jeng AY: Enhanced expression of renal endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-A-receptor mRNA in rats with interstitial fibrosis following ureter ligation. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000;36:S255-S259.
89. Fern RJ, Yesko CM, Thornhill BA, Kim HS, Smithies O, Chevalier RL: Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J.Clin.Invest* 1999;103:39-46.
90. Ferrara N, Alitalo K: Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat.Med.* 1999;5:1359-1364.

91. Fine L: The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1986;29:619-634.
92. Fine LG, Trizna W, Bourgoignie JJ, Bricker NS: Functional profile of the isolated uremic nephron. Role of compensatory hypertrophy in the control of fluid reabsorption by the proximal straight tubule. *J.Clin.Invest* 1978;61:1508-1518.
93. Fink GD, Fisher JW: Erythropoietin production after renal denervation or beta-adrenergic blockade. *Am.J.Physiol* 1976;230:508-513.
94. Fink GD, Fisher JW: Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists. I. Characterization of activity in polycythemic mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1977;202:192-198.
95. Fink GD, Fisher JW: Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists. II. Mechanism of action. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1977;202:199-208.
96. Fink GD, Paulo LG, Fisher JW: Effects of beta adrenergic blocking agents on erythropoietin production in rabbits exposed to hypoxia. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1975;193:176-181.
97. Finne PH, Skoglund RW: Erythropoietin production in the rat following splanchnic neurectomy. *J.Lab Clin.Med.* 1970;76:103-106.
98. Fisher JW, Knight DB, Couch C: The influence of several diuretic drugs on erythropoietin formation. *J.Pharmacol.Exp Ther.* 1963;141:113-121.
99. Fisher JW, Roh BL, Malgor LA, Noveck RJ: Effects of vasoactive agents on erythropoietin production. *Isr.J.Med.Sci.* 1971;7:977-985.
100. Fisher JW, Samuels A, Langston J: Effects of angiotensin, norepinephrine and renal artery constriction on erythropoietin production. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1968;149:308-317.
101. Fisher JW, Samuels AI: Relationship between renal blood flow and erythropoietin production in dogs. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1967;125:482-485.
102. Fletcher EC, Bao G, Li R: Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension* 1999;34:309-314.
103. Fray JC, Lush DJ: Stretch receptor hypothesis for renin secretion: the role of calcium. *J.Hypertens.* 1984;2:19-23.
104. Fried W: Erythropoietin and the kidney. *Nephron* 1975;15:327-349.
105. Fried W, Barone-Varelas J, Morley C: Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* 1984;10:287-304.

106. Frokiaer J, Djurhuus JC, Nielsen M, Pedersen EB: Renal hemodynamic response to ureteral obstruction during converting enzyme inhibition. *Urol.Res.* 1996;24:217-227.
107. Frokiaer J, Knudsen L, Nielsen AS, Pedersen EB, Djurhuus JC: Enhanced intrarenal angiotensin II generation in response to obstruction of the pig ureter. *Am.J.Physiol* 1992;263:F527-F533.
108. Frokiaer J, Nielsen AS, Knudsen L, Djurhuus JC, Pedersen EB: The effect of indomethacin infusion on renal hemodynamics and on the renin-angiotensin system during unilateral ureteral obstruction of the pig. *J.Urol.* 1993;150:1557-1563.
109. Fu P, Evans B, Lim GB, Moritz K, Wintour EM: The sheep erythropoietin gene: molecular cloning and effect of hemorrhage on plasma erythropoietin and renal/liver messenger RNA in adult sheep. *Mol.Cell Endocrinol.* 1993;93:107-116.
110. Fugelseth D, Lindemann R, Liestol K, Kiserud T, Langslet A: Ultrasonographic study of ductus venosus in healthy neonates. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:F131-F134.
111. Fugelseth D, Lindemann R, Liestol K, Kiserud T, Langslet A: Postnatal closure of ductus venosus in preterm infants ≤ 32 weeks. An ultrasonographic study. *Early Hum.Dev.* 1998;53:163-169.
112. Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ: Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat.Med.* 2001;7:598-604.
113. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS: A model of hypoxic renal failure. *J.Surg.Res.* 1988;44:764-771.
114. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS: Effect of hypoxia on renal flow. *J.Trauma* 1988;28:955-961.
115. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS: The contribution of hypoxia to postischemic renal dysfunction. *Surgery* 1988;104:257-265.
116. Ganong WF, Porter JP, Bahnson TD, Said SI: Peptides and neurotransmitters that affect renin secretion. *J.Hypertens.* 1984;2 Suppl 1:75-82.
117. Gidding SS, Stockman JA, III: Erythropoietin in cyanotic heart disease. *Am.Heart J.* 1988;116:128-132.
118. Gleiter CH, Becker T, Schreeb KH, Freudenthaler S, Gundert-Remy U: Fenoterol but not dobutamine increases erythropoietin production in humans. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1997;61:669-676.

119. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF: Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412-1415.
120. Goldberg MA, Schneider TJ: Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J.Biol.Chem.* 1994;269:4355-4359.
121. Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F., and Summerville, W. W. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Exp Med* 59, 347-379. 1934.
122. Goldblatt PJ, Gohara AF, Khan NH, Hampton JA: Benign and malignant nephrosclerosis and renovascular hypertension; in: Tisher CC, Brenner BM (eds): *Renal Pathology with Clinical and Functional Correlations*. Philadelphia, JB Lippincott Company pp 1131-1162.
123. Golenhofen K: Blutkreislauf; in: Urban & Schwarzenberg (ed): *Physiologie heute*. pp 219-267.
124. Golin R, Pieruzzi F, Munforti C, Busca G, Di Blasio A, Zanchetti A: Role of the renal nerves in the control of renin synthesis during different sodium intakes in the rat. *J.Hypertens.* 2001;19:1271-1277.
125. Goormaghtigh N: Une glande endocrine dans la paroi des arterioles renales. *Bruxelles Med* 1939;19:1541.
126. Gottschalk CW, Moss N.G., Colindres RE: Neural control of renal function in health and disease; in: Seldin DW, Giebisch G (eds): *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. New York, Raven pp 581-611.
127. Gould AB, Goodman S, DeWolf R, Onesti G, Swartz C: Interrelation of the renin system and erythropoietin in rats. *J.Lab Clin.Med* 1980;96:523-534.
128. Gould AB, Goodman SA, Green D: An in vivo effect of renin on erythropoietin formation. *Lab Invest* 1973;28:719-722.
129. Gowdy CW: The autonomic nervous system in hypoxia; in: Hatcher JD, Jennings DB (eds): *Proceedings of the International Symposium on the Cardiovascular and Respiratory Effects of Hypoxia*. New York, Hafner Publishing & Co. pp 232-247.
130. Greene EL, Kren S, Hostetter TH: Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J.Clin.Invest* 1996;98:1063-1068.

131. Gross DM, Fisher JW: Effects of terbutaline, a synthetic beta adrenoceptor agonist, on in vivo erythropoietin production. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 1978;236:192-201.
132. Gross DM, Mujovic VM, Jubiz W, Fisher JW: Enhanced erythropoietin and prostaglandin E production in the dog following renal artery constriction. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1976;151:498-501.
133. Grouzmann E, Alvarez-Bolado G, Meyer C, Osterheld MC, Burnier M, Brunner HR, Waeber B: Localization of neuropeptide Y and its C-terminal flanking peptide in human renal tissue. *Peptides* 1994;15:1377-1382.
134. Grouzmann E, Werffeli-George P, Fathi M, Burnier M, Waeber B, Waeber G: Angiotensin-II mediates norepinephrine and neuropeptide-Y secretion in a human pheochromocytoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1994;79:1852-1856.
135. Grover RF, Selland MA, McCullough RG, Dahms TE, Wolfel EE, Butterfield GE, Reeves JT, Greenleaf JE: Beta-adrenergic blockade does not prevent polycythemia or decrease in plasma volume in men at 4300 m altitude. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 1998;77:264-270.
136. Gruenwald P: *Am.J.Clin.Pathol.* 1949;19:801-813.
137. Guo L, Richardson KS, Tucker LM, Doll MA, Hein DW, Arteel GE: Role of the renin-angiotensin system in hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Hepatology* 2004;40:583-589.
138. Hackenthal E, Aktories K, Jakobs KH, Lang RE: Neuropeptide Y inhibits renin release by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Am.J.Physiol* 1987;252:F543-F550.
139. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R: Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990;70:1067-1116.
140. Haefliger JA, Waeber B, Grouzmann E, Braissant O, Nussberger J, Nicod P, Waeber G: Cellular localization, expression and regulation of neuropeptide Y in kidneys of hypertensive rats. *Regul.Pept.* 1999;82:35-43.
141. Halvorsen S: Plasma erythropoietin levels following hypothalamic stimulation in the rabbit. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1961;13:564-575.
142. Halvorsen S: Effects of hypothalamic lesions on the erythropoietic response to hypoxia in rabbits. *Acta Physiol Scand.* 1964;61:1-19.
143. Halvorsen S: The central nervous system in regulation of erythropoiesis. *Acta Haematol.* 1966;35:65-79.

144. Handa RK, Johns EJ: Interaction of the renin-angiotensin system and the renal nerves in the regulation of rat kidney function. *J.Physiol* 1985;369:311-321.
145. Handa RK, Johns EJ: The role of angiotensin II in the renal responses to somatic nerve stimulation in the rat. *J.Physiol* 1987;393:425-436.
146. Hansen AJ, Fogh J, Mollgard K, Sorensen SC: Evidence against erythropoietin production by the carotid body. *Respir.Physiol* 1973;18:101-106.
147. Hanson AS, Linas SL: Beta-adrenergic receptor function in rat proximal tubule epithelial cells in culture. *Am.J.Physiol* 1995;268:F553-F560.
148. Harris AL: Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:38-47.
149. Harris DC, Chan L, Schrier RW: Remnant kidney hypermetabolism and progression of chronic renal failure. *Am.J.Physiol* 1988;254:F267-F276.
150. Harris RC, Seifter JL, Brenner BM: Adaptation of Na⁺-H⁺ exchange in renal microvillus membrane vesicles. Role of dietary protein and uninephrectomy. *J.Clin.Invest* 1984;74:1979-1987.
151. Herkens C, Wolff M, Fandrey J, Schuler F, Jelkmann W: Immunocytochemical demonstration of erythropoietin in hypoxic human hepatoma cultures. *Histochemistry* 1993;100:303-309.
152. Hernandez-Llamas G, Palafox-Cervantes G, Borboa-Osuna AL, Urrecha-Manzano J, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, Cuetos-Martinez C: Role of the renin-angiotensin system in arterial hypertension secondary to acute unilateral urinary obstruction. *Ren Fail.* 1994;16:673-679.
153. Hilbrands LB, Hoitsma AJ, Koene RA: Post-transplant haemoglobin levels and host kidney status. *Transpl.Int.* 1992;5 Suppl 1:S73-S74.
154. Hirth P, Wieczorek L, Scigalla P: Molecular biology of erythropoietin. *Contrib.Nephrol.* 1988;66:38-53.
155. Ho VT, Bunn HF: Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 1996;223:175-180.
156. Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P: Tissue hypoxxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2000;278:R513-R519.
157. Hogan RP, III, Kotchen TA, Boyd AE, III, Hartley LH: Effect of altitude on renin-aldosterone system and metabolism of water and electrolytes. *J.Appl.Physiol* 1973;35:385-390.

158. Holdaas H: Adrenergic control of renin release. *J.Oslo.City Hosp.* 1983;33:111-127.
159. Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Kramer BK, Riegger GA, Kurtz A: Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J.Hypertens.* 1997;15:1471-1479.
160. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM: Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2001;12:1315-1325.
161. Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF: Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J.Biol.Chem.* 1999;274:9038-9044.
162. Hudgson P, Pearce JM, Yeates WK: Renal artery stenosis with hypertension and high haematocrit. *Br.Med J.* 1967;1:18-21.
163. Huet PM, Villeneuve JP, Pomier-Layrargues G, Marleau D: Hepatic circulation in cirrhosis. *Clin.Gastroenterol.* 1985;14:155-168.
164. Hvistendahl JJ, Pedersen TS, Jorgensen HH, Rehling M, Frokiaer J: Renal hemodynamic response to graded ureter obstruction in the pig. *Nephron* 1996;74:168-174.
165. Ibrahim H, Kahn E, Harper RG, Wapnir RA: Erythropoietin (EPO) levels in fetal rats after ritodrine and terbutaline administration. *Biochem Med.Metab Biol.* 1994;52:128-131.
166. Ibrahim HN, Hostetter TH: The renin-aldosterone axis in two models of reduced renal mass in the rat. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1998;9:72-76.
167. Imbs JL, Kraetz J, Schmidt M, Desaulles E, Schwartz J: beta-blocking drugs and renin secretion in the anaesthetized dog. *Clin.Sci.Mol.Med Suppl* 1975;2:105s-107s.
168. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Klahr S: Delayed treatment with enalapril halts tubulointerstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 1996;49:1110-1119.
169. Ito S, Juncos LA, Nushiro N, Johnson CS, Carretero OA: Endothelium-derived relaxing factor modulates endothelin action in afferent arterioles. *Hypertension* 1991;17:1052-1056.
170. Ivan M, Kaelin WG, Jr.: The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2001;11:27-34.

171. Iwao H, Kimura S, Fukui K, Nakamura A, Tamaki T, Ohkubo H, Nakanishi S, Abe Y: Elevated angiotensinogen mRNA levels in rat liver by nephrectomy. *Am.J.Physiol* 1990;258:E413-E417.
172. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-472.
173. Jacob F, Ariza P, Osborn JW: Renal denervation chronically lowers arterial pressure independent of dietary sodium intake in normal rats. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2003;284:H2302-H2310.
174. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, .: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-810.
175. Jacobson MD: Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Curr.Biol.* 1997;7:R277-R281.
176. Jain S, Wilke WL, Tucker A: Age-dependent effects of chronic hypoxia on renin-angiotensin and urinary excretions. *J.Appl.Physiol* 1990;69:141-146.
177. Jelkmann W: Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992;72:449-489.
178. Jelkmann W: Biology of erythropoietin. *Clin.Investig.* 1994;72:S3-10.
179. Jelkmann W: The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 2001;13:791-801.
180. Jelkmann W, Bauer C: Demonstration of high levels of erythropoietin in rat kidneys following hypoxic hypoxia. *Pflugers Arch.* 1981;392:34-39.
181. Jelkmann W, Brookins J, Fisher JW: Indomethacin blockade of albuterol-induced erythropoietin production in isolated perfused dog kidneys. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1979;162:65-70.
182. Jelkmann W, Marienhoff N, Giesselmann S, Busch L: Lowered plasma erythropoietin in hypoxic rats with kidney tubule lesions. *Blut* 1988;57:317-321.
183. Jelkmann W, Seidl J: Dependence of erythropoietin production on blood oxygen affinity and hemoglobin concentration in rats. *Biomed.Biochim.Acta* 1987;46:S304-S308.

184. Jensen A, Berger R: Fetal circulatory responses to oxygen lack. *J.Dev.Physiol* 1991;16:181-207.
185. Jernigan NL, O'Donoghuy TL, Walker BR: Correlation of HO-1 expression with onset and reversal of hypoxia-induced vasoconstrictor hyporeactivity. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001;281:H298-H307.
186. Johns EJ, Manitius J: The renal actions of nitrendipine and its influence on the neural regulation of calcium and sodium reabsorption in the rat. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1987;9 Suppl 1:S49-S56.
187. Johnston JR, Brenner BM, Hebert SC: Uninephrectomy and dietary protein affect fluid absorption in rabbit proximal straight tubules. *Am.J.Physiol* 1987;253:F222-F233.
188. Jungermann K, Kietzmann T: Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 2000;31:255-260.
189. Kamper AL, Nielsen OJ: Effect of enalapril on haemoglobin and serum erythropoietin in patients with chronic nephropathy. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1990;50:611-618.
190. Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S: Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int.* 1994;45:1637-1647.
191. Kato A, Hishida A, Tanaka I, Komatsu K: Uninephrectomy prevents the ischemia-induced increase in renin activity. *Nephron* 1997;75:72-76.
192. Kentera D, Susic D, Cemerikic D: Plasma renin activity and hypertrophy of the right ventricle in hypoxic rats. *Basic Res.Cardiol.* 1979;74:445-450.
193. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972;26:239-257.
194. Khan MA, Dashwood MR, Thompson CS, Mumtaz FH, Mikhailidis DP, Morgan RJ: Time-dependent up-regulation of endothelin-A receptors and down-regulation of endothelin-B receptors and nitric oxide synthase binding sites in the renal medulla of a rabbit model of partial bladder outlet obstruction: potential clinical relevance. *BJU.Int.* 1999;84:1073-1080.
195. Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaressi S, Jungermann K: Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver. *Biochem J.* 2001;354:531-537.
196. Kiil F, Aukland K, Refsum HE: Renal sodium transport and oxygen consumption. *Am.J.Physiol* 1961;201:511-516.

197. Kilavuz O, Vetter K: Is the liver of the fetus the 4th preferential organ for arterial blood supply besides brain, heart, and adrenal glands? *J.Perinat.Med.* 1999;27:103-106.
198. Kim S, Iwao H, Nakamura N, Ikemoto F, Yamamoto K, Mizuhira V, Yokofujita J: Metabolism of circulating renin by liver and kidney of rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1987;10 Suppl 7:S94-S95.
199. King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA: Anemia of chronic renal failure in dogs. *J.Vet.Intern.Med* 1992;6:264-270.
200. Kiserud T, Ozaki T, Nishina H, Rodeck C, Hanson MA: Effect of NO, phenylephrine, and hypoxemia on ductus venosus diameter in fetal sheep. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;279:H1166-H1171.
201. Kiserud T, Rasmussen S, Skulstad S: Blood flow and the degree of shunting through the ductus venosus in the human fetus. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2000;182:147-153.
202. Kiserud T, Stratford L, Hanson MA: Umbilical flow distribution to the liver and the ductus venosus: an in vitro investigation of the fluid dynamic mechanisms in the fetal sheep. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1997;177:86-90.
203. Kline RL, Mercer PF: Functional reinnervation and development of supersensitivity to NE after renal denervation in rats. *Am.J.Physiol* 1980;238:R353-R358.
204. Knight DS, Beal JA, Fabre RD, Henderson RJ, Jr.: Catecholamine-containing, dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive perivascular nerve specializations in the rat kidney. *Anat.Rec.* 1989;225:77-86.
205. Knight DS, Fabre RD, Beal JA: Identification of noradrenergic nerve terminals immunoreactive for neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in the rat kidney. *Am.J.Anat.* 1989;184:190-204.
206. Knudtzon J, Myhre K, Rasch W, Neslein IL, Bogsnes A, Opstad PK: Reduced systolic blood pressure elevations during maximum exercise at simulated altitudes. *Aviat.Space Environ.Med* 1989;60:1072-1076.
207. Kokot F, Bulanowski Z, Bochenek A, Herman ZS, Wiczorek M, Wos S: Metabolic effects of long-term arterialization of portal blood. *Acta Physiol Pol.* 1986;37:69-78.
208. Kokubu T, Hiwada K, Yamamura Y: Effects of unilateral nephrectomy on plasma renin substrate and renin concentration in rats. *Pflugers Arch.* 1975;358:303-310.
209. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL: Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991;77:2497-2503.

210. Kramer BK, Ritthaler T, Schweda F, Kees F, Schrickler K, Holmer SR, Kurtz A: Effects of hypoxia on renin secretion and renal renin gene expression. *Kidney Int.Suppl* 1998;67:S155-S158.
211. Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Kieninger M, Wagner C: Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am.J.Physiol* 1998;274:F709-F717.
212. Kurtz A, Jelkmann W, Pfuhl A, Malmstrom K, Bauer C: Erythropoietin production by fetal mouse liver cells in response to hypoxia and adenylate cyclase stimulation. *Endocrinology* 1986;118:567-572.
213. Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Millberg BI, Gnadinger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hokfelt T, Fischer JA: Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J.Clin.Invest* 1988;82:538-543.
214. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW: Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J.Clin.Invest* 1992;90:766-771.
215. Lakhani PP, Amenta F, Napoleone P, Felici L, Eikenburg DC: Pharmacological characterization and anatomical localization of prejunctional beta-adrenoceptors in the rat kidney. *Br.J.Pharmacol.* 1994;111:1296-1308.
216. Larhammar D: Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul.Pept.* 1996;62:1-11.
217. Lassen NA: [Correlations between renal function and oxygen consumption]. *Minerva Cardioangiol.* 1961;9:433.
218. Lemery DJ, Santolaya J, Serre AF, Denoix S, Besse GH, Vanlieferinghen PC, Bezou MJ, Gaillard G, Jacquetin B: Serum erythropoietin in small for gestational age fetuses. *Biol.Neonate* 1994;65:89-93.
219. Lerman LO, Rodriguez-Porcel M: Functional assessment of the circulation of the single kidney. *Hypertension* 2001;38:625-629.
220. Leung PS: The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr.Protein Pept.Sci.* 2004;5:267-273.
221. Lim GB, Moritz K, Jeyaseelan K, Wintour EM: Effect of hemorrhage and nephrectomy on erythropoietin gene expression in the ovine fetus. *Mol.Cell Endocrinol.* 1996;117:101-109.
222. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, .: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985;82:7580-7584.

223. Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S: Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J.Biol.Chem.* 1998;273:15257-15262.
224. Loberant N, Barak M, Gaitini D, Herskovits M, Ben Elisha M, Roguin N: Closure of the ductus venosus in neonates: findings on real-time gray-scale, color-flow Doppler, and duplex Doppler sonography. *AJR Am.J.Roentgenol.* 1992;159:1083-1085.
225. Loberant N, Herskovits M, Barak M, Ben Elisha M, Herschkowitz S, Sela S, Roguin N: Closure of the ductus venosus in premature infants: findings on real-time gray-scale, color-flow Doppler, and duplex Doppler sonography. *AJR Am.J.Roentgenol.* 1999;172:227-229.
226. Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Urena J, Gonzalez C: Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 1988;241:580-582.
227. Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skott O, Briggs JP: Characterization of the macula densa stimulus for renin secretion. *Am.J.Physiol* 1990;259:F186-F193.
228. Lowy PH, Keighley G, Cohen NS: Stimulation by serotonin of erythropoietin-dependent erythropoiesis in mice. *Br.J.Haematol.* 1970;19:711-718.
229. Lundberg JM, Fried G, Pernow J, Theodorsson-Norheim E: Co-release of neuropeptide Y and catecholamines upon adrenal activation in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1986;126:231-238.
230. Lundberg JM, Hemsén A, Fried G, Theodorsson-Norheim E, Lagercrantz H: Co-release of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity and catecholamines in newborn infants. *Acta Physiol Scand.* 1986;126:471-473.
231. Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M: Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand.* 1982;116:477-480.
232. Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1997;37:517-554.
233. Malgor LA, Fisher JW: Effects of testosterone on erythropoietin production in isolated perfused kidneys. *Am.J.Physiol* 1970;218:1732-1736.

234. Mann B, Hartner A, Jensen BL, Hilgers KF, Hocherl K, Kramer BK, Kurtz A: Acute upregulation of COX-2 by renal artery stenosis. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2001;280:F119-F125.
235. Mann DL, Donati RM, Gallagher NI: Relationship of renal mass to erythropoietin production. *Lab Invest* 1968;19:406-411.
236. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M: Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur.J.Neurosci.* 1996;8:666-676.
237. Martin SW, Broadley KJ: Effects of chronic intravenous infusions of dopexamine and isoprenaline to rats on D1-, beta 1- and beta 2-receptor-mediated responses. *Br.J.Pharmacol.* 1994;112:595-603.
238. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R: A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J.Biol.Chem.* 1994;269:19488-19493.
239. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Johnson MH, Ratcliffe PJ: The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression. *Kidney Int.* 1997;52:715-724.
240. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJ, Johnson MH, Ratcliffe PJ: Erythropoietin-producing cells in transgenic mice expressing SV40 large T antigen directed by erythropoietin control sequences. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994;718:356-358.
241. Melchiorri P, Sopranzi N, Roseghini M: Effects of bombesin on erythropoietin production in the anaesthetized dog. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1976;294:193-197.
242. Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux JP, Corvol P: Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin.Exp Hypertens.A* 1983;5:1005-1019.
243. Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T: XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol.Rev.* 1998;50:143-150.
244. Milledge JS, Cotes PM: Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *J.Appl.Physiol* 1985;59:360-364.
245. Miller ME, Chandra M, Garcia JF: Clinical applications of measurement of serum immunoreactive levels of erythropoietin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1985;459:375-381.

246. Miller ME, Rorth M, Parving HH, Howard D, Reddington I, Valeri CR, Stohlman F, Jr.: pH effect on erythropoietin response to hypoxia. *N.Engl.J.Med.* 1973;288:706-710.
247. Mirand EA, Prentice TC, Grace JT: Ability of Tamarins to produce and respond to Erythropoietin. *Nature* 1964;204:1064-1066.
248. Mitchell GAG: The nerve supply of the kidney. *Acta Anat.* 1950;10:1-37.
249. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E: Purification of human erythropoietin. *J.Biol.Chem.* 1977;252:5558-5564.
250. Mizelle HL, Hall JE, Woods LL: Interactions between angiotensin II and renal nerves during chronic sodium deprivation. *Am.J.Physiol* 1988;255:F823-F827.
251. Modin A, Pernow J, Lundberg JM: Repeated renal and splenic sympathetic nerve stimulation in anaesthetized pigs: maintained overflow of neuropeptide Y in controls but not after reserpine. *J.Auton.Nerv.Syst.* 1994;49:123-134.
252. Moody TE, Vaughan ED, Jr., Gillenwater JY: Comparison of the renal hemodynamic response to unilateral and bilateral ureteral occlusion. *Invest Urol.* 1977;14:455-459.
253. Moody TE, Vaughn ED, Jr., Gillenwater JY: Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral ureteral occlusion. Implications for changing sites of increased renal resistance. *Invest Urol.* 1975;13:246-251.
254. Morin FC, III: Prostaglandin E1 opens the ductus venosus in the newborn lamb. *Pediatr.Res.* 1987;21:225-228.
255. Morita T, Kourembanas S: Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J.Clin.Invest* 1995;96:2676-2682.
256. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM: Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am.J.Physiol* 1997;273:R1829-R1844.
257. Morrison AR, Moritz H, Needleman P: Mechanism of enhanced renal prostaglandin biosynthesis in ureter obstruction. Role of de novo protein synthesis. *J.Biol.Chem.* 1978;253:8210-8212.
258. Muhlbauer B, Osswald H: Feeding-induced increase in urinary dopamine excretion is independent of renal innervation and sodium intake. *Am.J.Physiol* 1994;266:F563-F567.

259. Muhlbauer B, Spohr F, Schmidt R, Osswald H: Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. *Am.J.Physiol* 1997;273:F144-F149.
260. Mujovic VM, Fisher JW: The effects of indomethacin on erythropoietin production in dogs following renal artery constriction. I. The possible role of prostaglandins in the generation of erythropoietin by the kidney. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1974;191:575-580.
261. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E, Breu V, Loffler BM, Ganten D, Schneider W, Haller H, Luft FC: Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension* 2000;36:282-290.
262. Murphy GP, Mirand EA, Johnston GS, Schirmer HK: Erythropoietin release in hypertensive dogs with renal artery stenosis. *Surg.Forum* 1966;17:499-500.
263. Naets JP, Garcia JF, Tousaaint C, Buset M, Waks D: Radioimmunoassay of erythropoietin in chronic uraemia or anephric patients. *Scand.J.Haematol.* 1986;37:390-394.
264. Naets JP, Wittek M: Erythropoietic activity of marrow and disappearance rate of erythropoietin in the rat. *Am.J.Physiol* 1969;217:297-301.
265. Nakatani T, Tamada S, Asai T, Iwai Y, Kim T, Tsujino T, Kumata N, Uchida J, Tashiro K, Kuwabara N, Komiya T, Sumi T, Okamura M, Miura K: Role of renin-angiotensin system and nuclear factor-kappaB in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral obstruction. *Jpn.J.Pharmacol.* 2002;90:361-364.
266. Necas E, Neuwirt J: The effect of inhibitors of energy metabolism on erythropoietin production. *J.Lab Clin.Med* 1972;79:388-396.
267. Necas E, Ponka P: Ureter obliteration transiently depresses erythropoietin production. *Eur.J.Clin.Invest* 1998;28:918-923.
268. Negelein, E. *Biochem.Z.* 243, 386-390. 1931.
Ref Type: Journal (Full)
269. Nelson LD, Osborn JL: Role of intrarenal ANG II in reflex neural stimulation of plasma renin activity and renal sodium reabsorption. *Am.J.Physiol* 1993;265:R392-R398.
270. 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* 1996;491 (Pt 2):479-488.
271. Nielsen K, Rehling M, Henriksen JH: Renal vein oxygen saturation in renal artery stenosis. *Clin.Physiol* 1992;12:179-184.

272. Nobiling R, Gabel M, Persson PB, Dietrich MS, Buhrle CP: Differential effect of neuropeptide-Y on membrane potential of cells in renal arterioles of the hydronephrotic mouse. *J.Physiol* 1991;444:317-327.
273. Norwood VF, Carey RM, Geary KM, Jose PA, Gomez RA, Chevalier RL: Neonatal ureteral obstruction stimulates recruitment of renin-secreting renal cortical cells. *Kidney Int.* 1994;45:1333-1339.
274. Novick AC, Gephardt G, Guz B, Steinmuller D, Tubbs RR: Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney. *N.Engl.J.Med.* 1991;325:1058-1062.
275. Oberhauser V, Vonend O, Rump LC: Neuropeptide Y and ATP interact to control renovascular resistance in the rat. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1999;10:1179-1185.
276. Oellerich WF, Malik KU: Neuropeptide Y modulates the vascular response to periarterial nerve stimulation primarily by a postjunctional action in the isolated perfused rat kidney. *J.Pharmacol.Exp Ther.* 1993;266:1321-1329.
277. Ohls RK: Erythropoietin and hypoxia inducible factor-1 expression in the mid-trimester human fetus. *Acta Paediatr.Suppl* 2002;91:27-30.
278. Ohtomo Y, Aperia A, Sahlgren B, Johansson BL, Wahren J: C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K(+)-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 1996;39:199-205.
279. Ohtomo Y, Meister B, Hokfelt T, Aperia A: Coexisting NPY and NE synergistically regulate renal tubular Na⁺, K(+)-ATPase activity. *Kidney Int.* 1994;45:1606-1613.
280. Olsen NV: Effect of hypoxaemia on water and sodium homeostatic hormones and renal function. *Acta Anaesthesiol.Scand.Suppl* 1995;107:165-170.
281. Osborn JL, Thames MD, DiBona GF: Role of macula densa in renal nerve modulation of renin secretion. *Am.J.Physiol* 1982;242:R367-R371.
282. Osswald H, Schmitz HJ, Kemper R: Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation. *Pflugers Arch.* 1977;371:45-49.
283. Pagel H, Jelkmann W, Weiss C: A comparison of the effects of renal artery constriction and anemia on the production of erythropoietin. *Pflugers Arch.* 1988;413:62-66.
284. Pagel H, Jelkmann W, Weiss C: O₂-supply to the kidneys and the production of erythropoietin. *Respir.Physiol* 1989;77:111-117.

285. Paulo LG, Fink GD, Roh BL, Fisher JW: Influence of carotid body ablation on erythropoietin production in rabbits. *Am.J.Physiol* 1973;224:442-444.
286. Pavlovic-Kentera V, Hall DP, Bragassa C, Lange RD: Unilateral renal hypoxia and production of erythropoietin. *J.Lab Clin.Med.* 1965;65:577-588.
287. Perazella MA, Bia MJ: Posttransplant erythrocytosis: case report and review of newer treatment modalities. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1993;3:1653-1659.
288. Peschle C, Marone G, Genovese A, Magli C, Condorelli M: Erythropoietin production in the rat: additive role of kidney and liver. *Am.J.Physiol* 1976;230:845-848.
289. Power GG, Longo LD: Fetal circulation times and their implications for tissue oxygenation. *Gynecol.Invest* 1975;6:342-355.
290. Preisig PA, Alpern RJ: Increased Na/H antiporter and Na/3HCO₃ symporter activities in chronic hyperfiltration. A model of cell hypertrophy. *J.Gen.Physiol* 1991;97:195-217.
291. Priyadarshi A, Periyasamy S, Burke TJ, Britton SL, Malhotra D, Shapiro JI: Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat. *Kidney Int.* 2002;61:542-546.
292. Pupilli C, Chevalier RL, Carey RM, Gomez RA: Distribution and content of renin and renin mRNA in remnant kidney of adult rat. *Am.J.Physiol* 1992;263:F731-F738.
293. Purkerson ML, Hoffsten PE, Klahr S: Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney Int.* 1976;9:407-417.
294. Purkerson ML, Joist JH, Yates J, Valdes A, Morrison A, Klahr S: Inhibition of thromboxane synthesis ameliorates the progressive kidney disease of rats with subtotal renal ablation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985;82:193-197.
295. Radtke HW, Jubiz W, Smith JB, Fisher JW: Albuterol-induced erythropoietin production and prostaglandins release in the isolated perfused dog kidney. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1980;214:467-471.
296. Ratcliffe PJ: Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int.* 1993;44:887-904.
297. Ratcliffe PJ, Ebert BL, Ferguson DJ, Firth JD, Gleadle JM, Maxwell PH, Pugh CW: Regulation of the erythropoietin gene. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1995;10 Suppl 2:18-27.

298. Recker F, Osswald H, Lutzeyer W: Die Rolle von Adenosin bei der renalen Hämodynamik nach 24stündiger Harnstauung der Rattenniere. *Experimentelle Urologie* 1985;167-171.
299. Reinecke M, Forssmann WG: Neuropeptide (neuropeptide Y, neurotensin, vasoactive intestinal polypeptide, substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin) immunohistochemistry and ultrastructure of renal nerves. *Histochemistry* 1988;89:1-9.
230. Reissmann KR, Diederich DA, Ito K, Schmaus JW: Influence of disappearance rate and distribution space on plasma concentration of erythropoietin in normal rats. *J.Lab Clin.Med.* 1965;65:967-975.
301. Reissmann KR, Nomura T, Gunn RW, Brosius F: Erythropoietic response to anemia or erythropoietin injection in uremic rats with or without functioning renal tissue. *Blood* 1960;16:1411-1423.
302. Reyes AA, Lefkowitz J, Pippin J, Klahr S: Role of the 5-lipoxygenase pathway in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 1992;41:100-106.
303. Ricci G, Masotti M, De P, V, Vedovato M, Zanotti G: Effects of a mixed physical activity (biathlon) on haematologic parameters, red cell 2,3-DPG and creatine, serum erythropoietin, urinary enzymes and microalbumin. *Eur.J.Haematol.* 1990;45:178-179.
304. Ritthaler T, Schrickler K, Kees F, Kramer B, Kurtz A: Acute hypoxia stimulates renin secretion and renin gene expression in vivo but not in vitro. *Am.J.Physiol* 1997;272:R1105-R1111.
305. Rogenes PR, Gottschalk CW: Renal function in conscious rats with chronic unilateral renal denervation. *Am.J.Physiol* 1982;242:F140-F148.
306. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH: Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J.Biol.Chem.* 1997;272:20055-20062.
307. Rosenberger C, Griethe W, Gruber G, Wiesener M, Frei U, Bachmann S, Eckardt KU: Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int.* 2003;64:874-886.
308. Rudolph AM: Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ.Res.* 1985;57:811-821.
309. Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J.Biol.Chem.* 1997;272:22642-22647.
310. Samtleben W, Gurland HJ: Pathogenese der renalen Anämie. *Cilag* 1990.

311. Scaro JL, Carrera MA, Prado de Tombolesi AR, Miranda C: Carbon monoxide and erythropoietin production in mice. *Acta Physiol Lat.Am.* 1975;25:204-210.
312. Schiller GJ, Berkman SA: Hematologic aspects of renal insufficiency. *Blood Rev.* 1989;3:141-146.
313. Schmidt W, Eckardt KU, Hilgendorf A, Strauch S, Bauer C: Effects of maximal and submaximal exercise under normoxic and hypoxic conditions on serum erythropoietin level. *Int.J.Sports Med.* 1991;12:457-461.
314. Scholz H, Kaissling B, Inagami T, Kurtz A: Differential response of renin secretion to vasoconstrictors in the isolated perfused rat kidney. *J.Physiol* 1991;441:453-468.
315. Schooley JC, Mahlmann LJ: Erythropoietin production in the anephric rat. I. Relationship between nephrectomy, time of hypoxic exposure, and erythropoietin production. *Blood* 1972;39:31-38.
316. Schuster SJ, Koury ST, Bohrer M, Salceda S, Caro J: Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats. *Br.J.Haematol.* 1992;81:153-159.
317. Schweda F, Blumberg FC, Schweda A, Nabel C, Holmer SR, Riegger GA, Pfeifer M, Kramer BK: Effects of chronic hypoxia on renal PDGF-A, PDGF-B, and VEGF gene expression in rats. *Nephron* 2000;86:161-166.
318. Semenza GL: HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2001;13:167-171.
319. Shimamura T, Morrison AB: A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am.J.Pathol.* 1975;79:95-106.
320. Shimizu Y, Miyazaki M, Shimizu H, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Yoshidome H, Nakajima N: Beneficial effects of arterialization of the portal vein on extended hepatectomy. *Br.J.Surg.* 2000;87:784-789.
321. Singbartl G, Frankenberg Ch, Schleinzner W: Erythropoietingabe, intravenöse Eisensubstitution und autologe Transfusion. *Chir Gastroenetrol* 1995;11:395-400.
322. Slick GL, Aguilera AJ, Zambraski EJ, DiBona GF, Kaloyanides GJ: Renal neuroadrenergic transmission. *Am.J.Physiol* 1975;229:60-65.
323. Smith FG: Renal sympathetic nerves do not modulate renal responses to haemorrhage in conscious lambs. *Exp.Physiol* 2002;87:557-562.

324. Smyth DD, Blandford DE, Thom SL: Disparate effects of neuropeptide Y and clonidine on the excretion of sodium and water in the rat. *Eur.J.Pharmacol.* 1988;152:157-162.
325. Sonkodi S, Abraham G, Mohacsi G: Effects of nephrectomy on hypertension, renin activity and total renal function in patients with chronic renal artery occlusion. *J.Hum.Hypertens.* 1990;4:277-279.
326. Sonkodi S, Kocsis J, Tichy B, Varro V: [Effect of decreased blood flow in the liver on blood pressure and on the renin-angiotensin system of the rat]. *Fiziol.Zh.SSSR Im I.M.Sechenova* 1983;69:540-546.
327. Srinivas V, Zhu X, Salceda S, Nakamura R, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) is a non-heme iron protein. Implications for oxygen sensing. *J.Biol.Chem.* 1998;273:18019-18022.
328. Sriparojthikoon W, Wyss JM: Cells of origin of the sympathetic renal innervation in rat. *Am.J.Physiol* 1987;252:F957-F963.
329. Steinberg SE, Garcia JF, Matzke GR, Mladenovic J: Erythropoietin kinetics in rats: generation and clearance. *Blood* 1986;67:646-649.
330. Steinhausen M, Snoei H, Parekh N, Baker R, Johnson PC: Hydronephrosis: a new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int.* 1983;23:794-806.
331. Sutton JR, Viol GW, Gray GW, McFadden M, Keane PM: Renin, aldosterone, electrolyte, and cortisol responses to hypoxic decompression. *J.Appl.Physiol* 1977;43:421-424.
332. Swenson ER, Duncan TB, Goldberg SV, Ramirez G, Ahmad S, Schoene RB: Diuretic effect of acute hypoxia in humans: relationship to hypoxic ventilatory responsiveness and renal hormones. *J.Appl.Physiol* 1995;78:377-383.
333. Sylvester JT, Scharf SM, Gilbert RD, Fitzgerald RS, Traystman RJ: Hypoxic and CO hypoxia in dogs: hemodynamics, carotid reflexes, and catecholamines. *Am.J.Physiol* 1979;236:H22-H28.
334. Taher MS, McLain LG, McDonald KM, Schrier RW, Gilbert LK, Aisenbrey GA, McCool AL: Effect of beta adrenergic blockade on renin response to renal nerve stimulation. *J.Clin.Invest* 1976;57:459-465.
335. Takahashi H, Kimura M, Hishida A, Nishimura M: Ureteral obstruction reverses glomerular proliferation in immune complex glomerulonephritis. *J.Lab Clin.Med.* 1999;133:289-301.
336. Takaku F, Hirashima K, Okinaka S: Studies on the mechanism of erythropoietin production. II. Effect of bilateral section of the splanchnic nerves. *J.Lab Clin.Med.* 1962;59:821-825.

337. Takeuchi J, Uchida E, Nakayama S, Takeda T, Yagi S, Inoue G, Ueda H: Experimental studies on the nervous control of the renal circulation. *Jpn.Heart J.* 1961;2:65-75.
338. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ: Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am.J.Physiol* 1992;263:F474-F481.
339. Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ: Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int.* 1991;40:69-76.
340. Tan CC, Tan LH, Eckardt KU: Erythropoietin production in rats with post-ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1996;50:1958-1964.
341. Tank JE, Moe OW, Star RA, Henrich WL: Differential regulation of rat glomerular and proximal tubular renin mRNA following uninephrectomy. *Am.J.Physiol* 1996;270:F776-F783.
342. Tarazi RC, Frohlich ED, Dustan HP, Gifford RW, Jr., Page IH: Hypertension and high hematocrit. Another clue to renal arterial disease. *Am.J.Cardiol.* 1966;18:855-858.
343. Taugner R, Buhle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R: Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib.Nephrol.* 1984;43:76-101.
344. Tchirikov M, Eisermann K, Rybakowski C, Schroder HJ: Doppler ultrasound evaluation of ductus venosus blood flow during acute hypoxemia in fetal lambs. *Ultrasound Obstet.Gynecol.* 1998;11:426-431.
345. Thaysen JH, Lassen NA, Munck O: Sodium transport and oxygen consumption in the mammalian kidney. *Naturwissenschaften* 1961;190:919-921.
346. Thorling EB, Erslev AJ: The "tissue" tension of oxygen and its relation to hematocrit and erythropoiesis. *Blood* 1968;31:332-343.
347. Thureau K: Renal Na-reabsorption and O₂-uptake in dogs during hypoxia and hydrochlorothiazide infusion. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1961;106:714-717.
348. Thureau K, Schnermann J: [The sodium concentration in the macula densa cells as a regulating factor for glomerular filtration (micropuncture experiments)]. *Klin.Wochenschr.* 1965;43:410-413.
349. Tobian L: Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells and hypertension. *Physiol Rev.* 1960;40:280-312.
350. Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T: Differential

- regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia. *Hypertension* 2002;40:34-40.
351. Tzaneva N, Natcheff N: Plasma renin activity in rats with renal denervation and adrenoreceptor blockers. *Acta Physiol Pharmacol.Bulg.* 1985;11:62-69.
352. Valentin JP, Sechi LA, Griffin CA, Humphreys MH, Schambelan M: [Gene expression of the renin-angiotensin system in compensatory renal hypertrophy secondary to contralateral nephrectomy]. *Arch.Mal Coeur Vaiss.* 1994;87:1115-1117.
353. Vaughan ED, Jr., Shenasky JH, Gillenwater JY: Mechanism of acute hemodynamic response to ureteral occlusion. *Invest Urol.* 1971;9:109-118.
354. Villarreal D, Freeman RH, Davis JO, Garoutte G, Sweet WD: Pathogenesis of one-kidney, one-clip hypertension in rats after renal denervation. *Am.J.Physiol* 1984;247:H61-H66.
355. Vreugdenhil G, Schrey G, van Es PN, Teng HT, de Leeuw PW: Erythropoietin production in hypertensive patients with and without renal artery stenosis. *Nephron* 1995;70:137-138.
356. Wagner C, Hinder M, Kramer BK, Kurtz A: Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 1999;34:1101-1105.
357. Walle AJ, Wong GY, Clemons GK, Garcia JF, Niedermayer W: Erythropoietin-hematocrit feedback circuit in the anemia of end-stage renal disease. *Kidney Int.* 1987;31:1205-1209.
358. Wang F, Fried W: Renal and extrarenal erythropoietin production in male and female rats of various ages. *J.Lab Clin.Med.* 1972;79:181-186.
359. Wang T, Chan YL: Neural control of distal tubular bicarbonate and fluid transport. *Am.J.Physiol* 1989;257:F72-F76.
360. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF: Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J.Biol.Chem.* 1994;269:22839-22846.
361. Wenger RH, Gassmann M: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol.Chem.* 1997;378:609-616.
362. Wharton J, Gordon L, Byrne J, Herzog H, Selbie LA, Moore K, Sullivan MH, Elder MG, Moscoso G, Taylor KM, .: Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:687-691.

363. Wide L, Bengtsson C, Birgegard G: Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br.J.Haematol.* 1989;72:85-90.
364. Wong PC, Hart SD, Timmermans PB: Effect of angiotensin II antagonism on canine renal sympathetic nerve function. *Hypertension* 1991;17:1127-1134.
365. Yarger WE, Griffith LD: Intrarenal hemodynamics following chronic unilateral ureteral obstruction in the dog. *Am.J.Physiol* 1974;227:816-826.
366. Yarger WE, Schocken DD, Harris RH: Obstructive nephropathy in the rat: possible roles for the renin-angiotensin system, prostaglandins, and thromboxanes in postobstructive renal function. *J.Clin.Invest* 1980;65:400-412.
367. Zanjani ED: Liver to kidney switch of erythropoietin formation. *Exp.Hematol.* 1980;8 Suppl 8:29-40.
368. Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC: Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J.Clin.Invest* 1981;67:1183-1188.
369. Zanjani ED, Contrera JF, Cooper GW, Gordon AS, Wong KK: Renal erythropoietic factor: role of ions and vasoactive agents in erythropoietin formation. *Science* 1967;156:1367-1368.
370. Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR: Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J.Lab Clin.Med.* 1977;89:640-644.
371. Zhang L, Yang Z, Shi BM, Li DP, Fang CY, Qiu FZ: Expression of local renin and angiotensinogen mRNA in cirrhotic portal hypertensive patient. *World J.Gastroenterol.* 2003;9:1584-1588.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADM	Adrenomedullin
Ang II	Angiotensin II
ART	Arterialisierung
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
COHb	Carboxyhämoglobin
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochromoxidase
DNX	Denervierung
ED ₅₀	Halbmaximale Dosis bei der ein bestimmter Effekt erzielt wird
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HCl	Hydrogeniumchlorid (Salzsäure)
HIF	Hypoxie induzierbarer Faktor
Hkt	Hämatokrit
HPLC	high performance liquid chromatography
KCl	Kaliumchlorid
log	Logarithmus
M	molar
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
mmol	Millimol

mRNA	messenger ribonucleic acid
μmol	Mikromol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-adeninucleotidphosphat
NPY	Neuropeptid Y
NX	einseitige Nephrektomie
NXX	subtotale Nephrektomie
pH	Potentielle Hydroniumionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PP	Pankreatisches Polypeptid
PRA	Plasmareninaktivität
PTE	Posttransplantationserythrozytose
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAS	Renin-Angiotensin-System
RBF	Renaler Blutfluss
rhEPO	rekombinantes human-Erythropoetin
RIA	Radioimmunoassay
RNA	ribonucleic acid
RR	Blutdruck nach Riva Rocci
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
TGF	tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Vehikel
V.	Vena
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol	Volumen
Vs.	versus

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine konstruktive Beratung und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Almut Grenz für ihr persönliches Engagement, ihre Hilfsbereitschaft und vorbildliche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Fotios Petroktistis für die Betreuung und engagierte Hilfe während des experimentellen Teils der Studie.

Frau Christine Piesch danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Katecholaminbestimmung mit Hilfe der HPLC. Des Weiteren danke ich Frau PD Dr. Margitta Albinus und ihrer Arbeitsgruppe für die Bestimmung der Plasmareninaktivität der untersuchten Tiere. Herrn Dr. Christoph Köhle möchte ich für die Auswertung der EPO-mRNA Proben mittels RT-PCR danken. Herrn Klaus Stieler danke ich für seine Unterstützung beim Aufbau des Projektes und das Erstellen von Skizzen und Schemata dieser Arbeit. Bei Herrn Walter Beer bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung von Probenmessungen.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts für die freundliche Aufnahme sowie für die gute Arbeitsatmosphäre während der experimentellen Phase meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Korrektur der Arbeit und ihre aufmunternde Unterstützung. Für die Hilfe beim Erstellen der Konstruktionszeichnung des CO-Käfigs danke ich meiner Schwester Caroline.

Lebenslauf

Cathérine Simone Gebhard

09.02.1978	geboren in Rheinfelden (Baden)
1984 - 1988	Grundschule Rippolingen-Harpolingen
1988 - 1997	Scheffel-Gymnasium Bad Säckingen
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife
Juni - Sept. 1997	Arbeit als Volunteer im Kibbuz En Gev (Israel)
Okt. - Dez. 1997	Med. Pflegepraktikum am KKH Bad Säckingen
Jan. - März 1998	Arbeit als Aushilfspflegekraft im Alten- und Pflegeheim St. Franziskus, Bad Säckingen
April 1998	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 2000	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003 - März 2004	Praktisches Jahr
	1. Tertial: Innere Medizin, Medizinische Klinik Universität Tübingen
	2. Tertial: Chirurgie, Lehrkrankenhäuser der University of London und der University of Newcastle upon Tyne, Großbritannien
	3. Tertial: Wahlfach Neurochirurgie, Health Sciences Centre der University of Western Ontario, Kanada
14. Mai 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Aug. 2004 – Nov. 2005	Ärztin im Praktikum am KKH Calw (Innere Medizin)
ab Dez. 2005	wiss. Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie, Abteilung Kardiovaskuläre Forschung, Universitätsspital Zürich (CH)