

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Direktor Prof. Dr. med. H. Ehmke

Die Rolle von Aldosteron und Volumenexpansion beim Blutdruckanstieg unter hoch Kalium-/Natrium-Diät

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Christian Johannes Marx
aus Reutlingen

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.08.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Christian Krebs

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Das Kreislaufsystem	5
1.2. Funktionen der Niere	6
1.3. Die Wirkungen von ANP und ADH	10
1.4. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	11
1.5. Das Aldosteron-Paradoxon.....	12
1.6. Bedeutung der Niere bei der Blutdruckregulation.....	13
1.7. Volkskrankheit Hypertonie	14
1.8. Ursachen der Hypertonie.....	15
1.9. Einfluss der Ernährung auf den Blutdruck	16
1.10. Veränderte Ernährungsgewohnheiten und deren Einfluss auf den Blutdruck	16
1.11. Effekte einer hohen Kalium-Zufuhr auf den Blutdruck und die renale Natriumausscheidung	17
1.12. Fragestellung	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Material	21
2.1.1. Chemikalien/Lösungen.....	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3. Medikamente/Cremes	22
2.1.4. Geräte	23
2.1.5. Software	23
2.1.6. Versuchstiere	24
2.1.7. Futter	24
2.2. Methoden.....	24
2.2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	24
2.2.2. Basis- und Diätfutter.....	25
2.2.3. Versuchsgruppen	26
2.2.4. Bestimmung des Plasmavolumens mittels Indikatorverdünnungsmethode:	28
2.2.5. ANP-Bestimmung.....	29
2.2.6. Blut-Gas-Analyse (BGA)	29
2.2.7. Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR):	30
2.2.8. Metabolischer Käfig (4 und 24 Stunden)	32
2.2.9. Elektrolytbestimmung in Urin und Plasma	34
2.2.10. Urinkreatinin	35
2.2.11. Bestimmung des spezifischen Gewichts von Urin	35
2.2.12. Operation des telemetrischen Blutdrucksenders	35

2.2.13. Blutdruckmessung mittels Telemetriesender	36
2.2.14. Spironolacton-Pellet Operation	37
2.2.15. Statistik.....	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Volumenexpansion	39
3.1.1. Plasmavolumen-Bestimmung	39
3.1.2. Hämatokrit.....	40
3.1.3. Atriales natriuretisches Peptid (ANP).....	41
3.2. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	42
3.3. Urinelektrolyte	45
3.3.1. Kalium-Ausscheidung	46
3.3.2. Natrium-Ausscheidung	48
3.4. Plasmaelektrolyte und Säure-Base-Status	49
3.4.1. Plasmaelektrolyte	50
3.4.2. Säure-Base-Status.....	53
3.5. Herzfrequenz (HF)	54
3.6. Blutdruck unter Spironolactonbehandlung	56
4. Diskussion	61
4.1. Hinweise auf eine renale Na ⁺ -Retention und Plasmavolumenexpansion.....	62
4.2. Säure-Base-Haushalt und dessen Einfluss auf die Na ⁺ -Retention	65
4.3. Ist eine Herzfrequenzsteigerung für den Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe verantwortlich?.....	66
4.4. Auswirkungen einer MR-Blockade auf den Blutdruck der hoch KCl-Gruppe.....	67
4.5. Kalium-Haushalt	68
5. Zusammenfassung und Ausblick	70
5.1. Zusammenfassung	70
5.2. Summary of the results	71
5.3. Ausblick	72
6. Abkürzungsverzeichnis	73
7. Literaturverzeichnis	77
8. Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen	84
9. Danksagung	85
10. Lebenslauf	86
11. Eidesstattliche Erklärung.....	87

1. Einleitung

1.1. Das Kreislaufsystem

Sauerstoff (O_2) ist eine Grundvoraussetzung für das Überleben jeder Zelle des Organismus. Eine ständige Versorgung muss daher gewährleistet sein. Bei Säugetieren übernimmt diese Funktion das Kreislaufsystem. Mit dessen Hilfe werden Sauerstoff und weitere zum Überleben notwendige Stoffe im Blut zu den Zellen gebracht, sowie Abfallprodukte des Zellstoffwechsels wie Kohlendioxid (CO_2) wieder abtransportiert. Das zentrale Organ des Kreislaufsystems ist das Herz. Dieses baut durch das pro Minute ausgeworfene sauerstoffreiche arterielle Blut (Herzzeitvolumen, HZV) in der Aorta einen Druck (P_a) auf, anhand dessen der totale periphere Widerstand (total peripheral resistance, TPR) überwunden wird. Nach Passage der Widerstandsgefäße und der Kapillaren fließt das sauerstoffarme venöse Blut im Niederdrucksystem in den rechten Vorhof des Herzens zurück. Der dort gemessene Druck wird als zentral venöser Druck (ZVD) bezeichnet. Von hier gelangt das Blut über den rechten Ventrikel weiter in die Lunge, wo eine O_2 -Aufnahme und eine CO_2 -Abgabe stattfinden. Die Druckdifferenz zwischen Arterien und Venen ist entscheidend für den Blutfluss im Organismus. Für den über die Zeit gemittelten arteriellen Druck (mittlerer arterieller Blutdruck, MAP) ergibt sich damit folgende Formel:

$$MAP - ZVD = HZV * TPR$$

Da der ZVD verhältnismäßig klein ist, kann dieser vernachlässigt werden. Des Weiteren ist das HZV als Produkt des Schlagvolumens des Herzens (SV) und dessen Frequenz (HF) definiert. So ergibt sich für den MAP:

$$MAP = SV * HF * TPR$$

Ein Blutdruckanstieg kann somit durch eine Erhöhung des SVs, der HF oder des TPRs erreicht werden. Ebenso hat das effektiv zirkulierende Volumen (EZV) Einfluss auf den MAP. Da eine Zunahme des EZVs zu einer vermehrten diastolischen Füllung des Herzens führt, erhöht sich mit Anstieg des EZVs auch das SV. Eines der zentralen Organe, welches für die Regulation des EZVs mitverantwortlich ist, ist die Niere (Klinke, 2010).

1.2. Funktionen der Niere

Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ, welches für eine Vielzahl von Aufgaben in unserem Körper zuständig ist. So übernehmen sie unter anderem die Elimination von harnpflichtigen Substanzen wie z.B. Harnsäure oder Harnstoff und beteiligen sich am Wasser- und Säure-Base-Haushalt. Zusätzlich sind sie für die genaue Regulation der Konzentration von Elektrolyten im Plasma, wie z.B. von Natrium (Na^+) und Kalium (K^+), verantwortlich (Klinke, 2010, Boron, 2005). Dies ist überlebensnotwendig, da die Na^+ -Konzentration $[\text{Na}^+]$ im Blut für die Aufrechterhaltung des EZVs und somit dem MAP verantwortlich ist (Boron, 2005), und Schwankungen der Plasmakalium-Konzentration $[\text{K}^+]$ im Sinne einer Hypo- oder einer Hyperkaliämie zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen können (Evans and Greenberg, 2005). All dies wird durch die Kooperation der glomerulären Filtration des Plasmas, der tubulären Sekretion und der Rückresorption gewährleistet. Diese stellen die drei Basisfunktionen der Niere dar (Boron, 2005). Als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beschreibt man die Menge an gebildetem Primärharn, welche pro Minute von den Glomeruli der beiden Nieren aus dem Plasma abfiltriert wird. Da die Plasmaelektrolyte frei filtriert werden, beträgt im Primärharn die $[\text{Na}^+]$ ungefähr 145 mmol/l. Geht man von einer normwertigen GFR des Menschen (85-135 ml/min pro 1,73 m² Körperoberfläche) aus, ergibt sich hieraus eine täglich filtrierte Na^+ -Menge von 18 bis 28 Mol (bzw. 410 bis 650 Gramm). Hierbei wird deutlich, dass die Nieren über ausreichende Resorptionsmechanismen verfügen müssen, da ansonsten eine enorme Menge Na^+ , und durch Osmose gleichzeitig auch Wasser, über den Urin verloren gehen würde. Wird dagegen zu viel Na^+ resorbiert, kommt es zu einer vermehrten Retention von Wasser (Klinke, 2010). Betrachtet man die tubuläre Sekretion und Rückresorption genauer, so werden ganze 60-70% des filtrierten Na^+ und K^+ bereits im proximalen Tubulus resorbiert. Hier findet der sogenannte Massentransport der Elektrolyte statt. Während der darauffolgenden Passage durch die sich anschließende Henle-Schleife werden weitere 25% des filtrierten Na^+ und 10-20% des filtrierten K^+ resorbiert. Somit gelangen nur etwa 10% des filtrierten Na^+ und K^+ in die distalen Nephron-Segmente (Palmer and Schnermann, 2015).

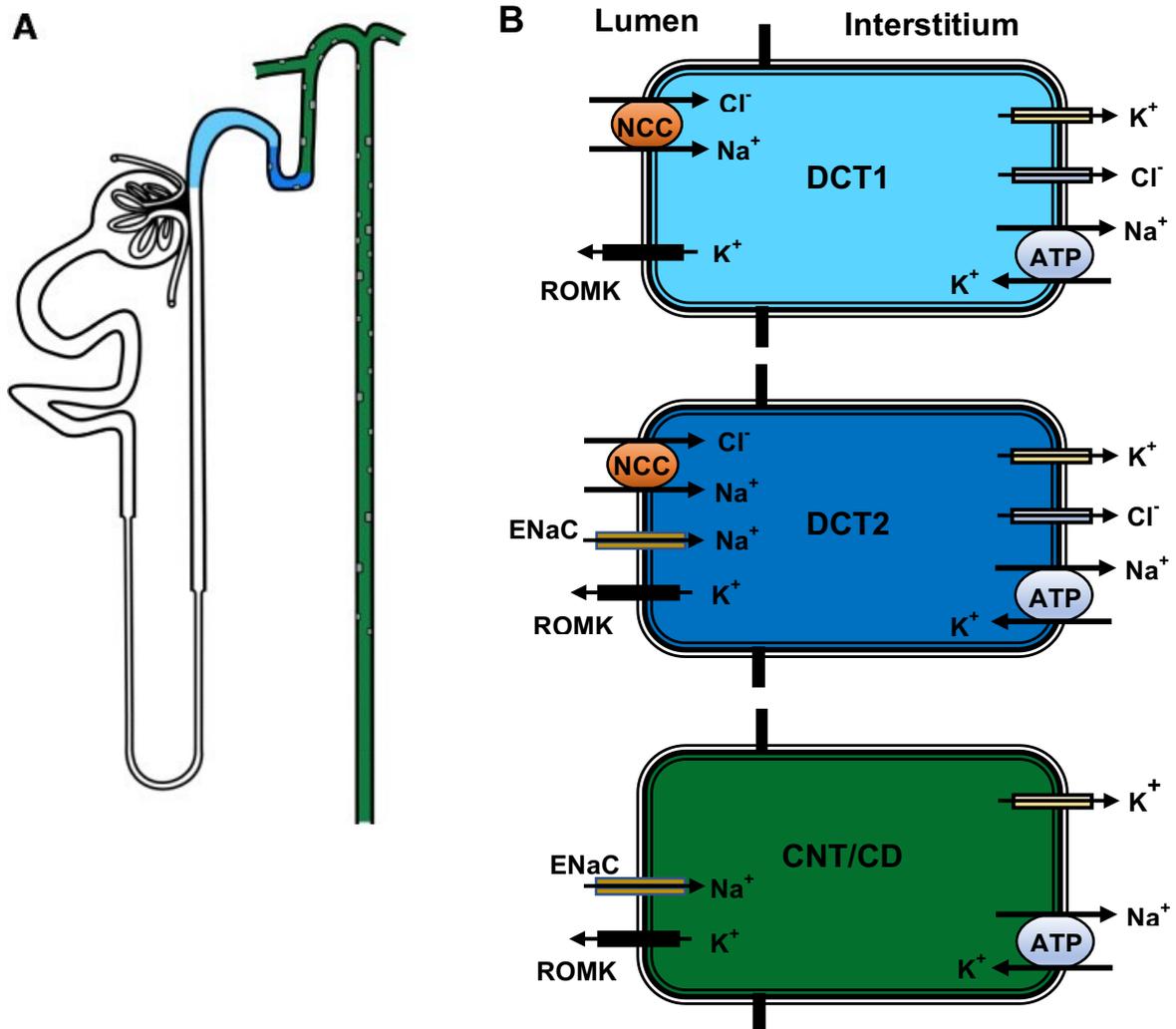


Abb. 1: A. Schematische Darstellung eines Nephrons. Die Strukturen des distalen Nephrons sind farblich markiert. Distaler konvoluter Tubulus DCT1 (hellblau) und DCT2 (dunkelblau), Verbindungstubulus CNT und Sammelrohr CD (grün) (Abb. modifiziert nach Penton et al. (Penton et al., 2015)). **B. Elektrolyttransporter des distalen Nephrons.** Schematische Zellmodelle der beteiligten Transporter der Na^+ -Resorption und K^+ -Sekretion der Hauptzellen im DCT1, DCT2, CNT und CD. Die einzelnen Transporter werden im Text näher erläutert.

Die distalen Nephron-Segmente entsprechen der Pars convoluta des distalen Tubulus (distal convoluted tubule, DCT), dem Verbindungstubulus (connecting tubule, CNT) und dem Sammelrohr (collecting duct, CD). Dieses wird wiederum in ein kortikales (cortical CD, CCD) und ein medulläres (medullary CD, MCD) Sammelrohr unterteilt (Abb. 1). Der proximale Anteil des DCT wird als DCT1 beschrieben, dort befindet sich hauptsächlich der Thiazid-sensitive NaCl-Cotransporter (NCC). Dieser sorgt für eine elektroneutrale Resorption von Na^+ und Chlorid (Cl^-). Im distalen Anteil des DCT

(DCT2) ist neben dem nun geringer auftretenden NCC noch zusätzlich der Amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal (ENaC) exprimiert. Dieser sorgt für eine elektrogene Aufnahme von Na^+ , was zu einem Lumen-negativen Potential führt. Das negative Potential fördert wiederum die apikale Sekretion von K^+ durch K^+ -Kanäle wie dem renal outer medullary potassium channel (ROMK) und die parazelluläre Resorption von Cl^- . Somit wird im distalen Nephron die Na^+ -Retention zunächst vom NCC übernommen (DCT1). Im DCT2 wird Na^+ sowohl über den NCC als auch über den ENaC resorbiert. Im CNT und CD erfolgt die Na^+ -Retention dann nahezu vollständig über die sogenannten Hauptzellen, die sowohl ENaC als auch ROMK exprimieren.

Zusätzlich zu den Hauptzellen befinden sich im CNT und CD die sogenannten Schaltzellen (intercalated cells, IC) (Arroyo et al., 2011, Palmer and Schnermann, 2015, Penton et al., 2015, Terker et al., 2015, Klinke, 2010). Diese können in drei Untergruppen eingeteilt werden; Typ A, Typ B und Nicht A/Nicht B Schaltzellen (Abb. 2)

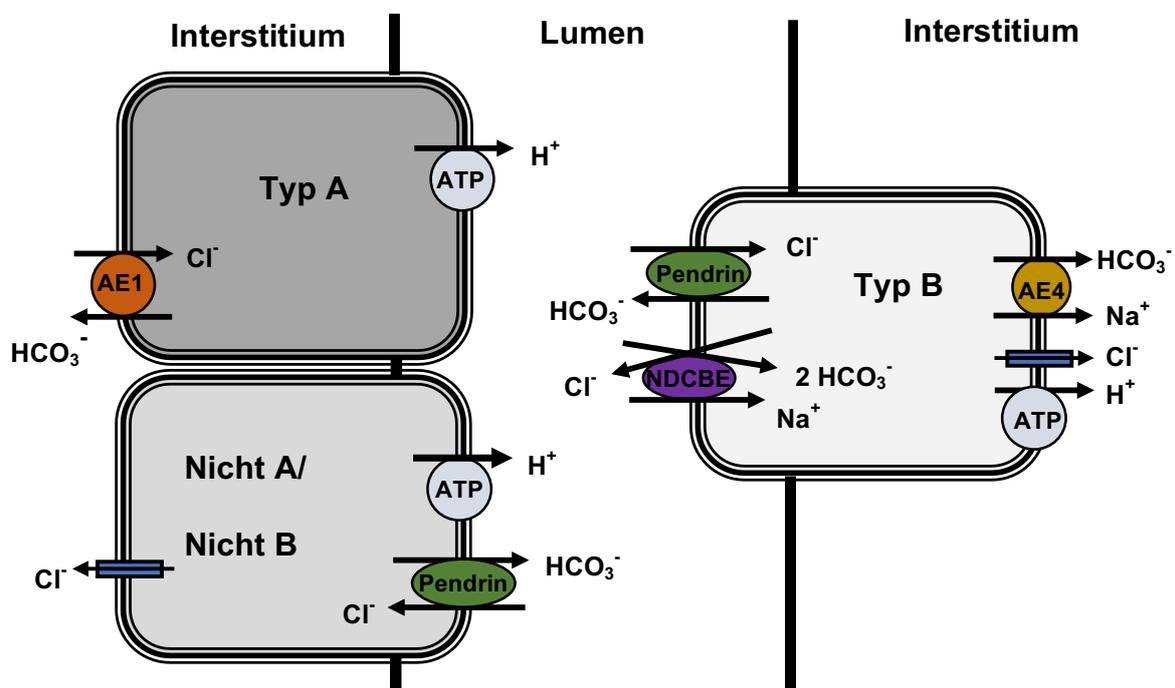


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Elektrolyttransporter der Typ A, Typ B, und Nicht A/Nicht B Schaltzellen. Die einzelnen Transporter werden im Text genauer erläutert.

Die Einteilung hängt von der Lokalisation der Protonen (H^+)-ATPase in der Zelle ab. Je nachdem ist die Zelle in der Lage entweder H^+ -Ionen oder Hydroxid-Ionen (OH^- -Äquivalente) in das Tubuluslumen abzugeben. Die Schaltzelle A exprimiert an der apikalen Membran die H^+ -ATPase und an der basolateralen Membran den Chlorid/Hydrogencarbonat (Cl^-/HCO_3^-)-Austauscher (anion exchanger 1, AE1). Dieser Zelltyp kommt vermehrt während einer Azidose vor, sodass durch das Sezernieren von H^+ und das Einhalten von OH^- -Äquivalenten der Azidose entgegengewirkt und der pH-Wert im Blut wieder erhöht wird. Im Gegensatz dazu erhöht sich bei einer Alkalose das Vorkommen der Schaltzelle B. Diese exprimiert vermehrt den Na^+ -unabhängigen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher (Pendrin) an ihrer apikalen und die H^+ -ATPase an ihrer basolateralen Membran. Somit kann HCO_3^- , ein OH^- -Äquivalent, ausgeschieden und H^+ dem Körper zurückgeführt werden. Beides senkt den pH-Wert im Blut und wirkt damit einer Alkalose entgegen. Bei den Nicht A/Nicht B Zellen ist sowohl die H^+ -ATPase als auch Pendrin auf der apikalen Membran exprimiert (Wall, 2016).

Nicht nur im Säure-Base-Haushalt, sondern auch in der elektroneutralen NaCl-Resorption und damit in der Regulation des EZV und des Blutdrucks spielen die Schaltzellen eine wichtige Rolle. So wird im CCD der größte Anteil von Cl^- hauptsächlich durch transzellulären Transport der Typ B und Nicht A/Nicht B Schaltzellen resorbiert. Insgesamt findet daher im Zusammenspiel mit der über den ENaC-vermittelten Na^+ -Retention der Hauptzellen und dem transzellulären Transport von Cl^- der Schaltzellen eine netto NaCl-Resorption statt (Wall, 2016, Wall and Lazo-Fernandez, 2015). Darüber hinaus resorbieren Schaltzellen über einen elektroneutralen, Thiazid-sensitiven Transportmechanismus auch Na^+ . Dies erfolgt über den Na^+ -abhängigen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher (NDCBE), welcher aufgrund des auswärts gerichteten Cl^- -Gradienten 1 Na^+ - und 2 HCO_3^- -Ionen in die Zelle schleust (Abb. 2). Durch den basolateral gelegenen Na^+/HCO_3^- -Cotransporter (AE4) verlassen Na^+ und HCO_3^- die Zelle (Eladari et al., 2014).

Des Weiteren spielen die Schaltzellen eine wichtige Rolle bei der K^+ -Ausscheidung. So tragen sie wahrscheinlich mithilfe des Calcium (Ca^{2+})-abhängigen maxi Kaliumkanals (BK) einen Großteil zur Fluss-induzierten K^+ -Sekretion bei (Rieg et al., 2007). Außerdem exprimieren sie neben der reinen H^+ -ATPase noch eine apikal liegende $H^+/-K^+$ -ATPase, welche für eine K^+ -Resorption und H^+ -Sekretion sorgen

kann. Somit können die Schaltzellen auf unterschiedliche physiologische Gegebenheit mit einer K^+ -Sekretion oder K^+ -Resorption reagieren (Penton et al., 2015).

Zusammenfassend zeigt sich, dass zur Aufrechterhaltung der NaCl-Homöostase in nahezu allen Nephronabschnitten Na^+ - und Cl^- -Retentionswege exprimiert sind. Zusätzlich trägt die Niere über die ROMK- und BK-vermittelte K^+ -Sekretion in den Haupt- und Schaltzellen zur Aufrechterhaltung des K^+ -Haushaltes bei. Da die homöostatische Kontrolle des Na^+ -, Cl^- - und K^+ -Haushaltes überlebenswichtig ist, stehen diese Retentions- und Sekretionsprozesse der Niere unter der Kontrolle von verschiedenen Hormonsystemen wie z.B. dem antidiuretischen Hormon (ADH), dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).

1.3. Die Wirkungen von ANP und ADH

Kommt es z.B. durch eine vermehrte NaCl-Zufuhr zu einem vergrößerten EZV, so führt die hierdurch ausgelöste Vorhofdehnung zur Ausschüttung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) aus Vorhofmyocyten (de Bold, 1985). Dieses Peptid führt in der Niere zu einer Vasodilatation der afferenten und zu einer Vasokonstriktion der efferenten Arteriolen der Glomeruli und erzielt somit anhand des erhöhten effektiven Filtrationsdruckes eine Zunahme der GFR. Mit Hilfe der gesteigerten Diurese kann so eine Normalisierung des EZVs erfolgen (Theilig and Wu, 2015). Im Gegensatz dazu kommt es z.B. bei einer starken Reduktion des EZVs oder bei einer Erhöhung der Osmolalität des Blutes zur Ausschüttung von ADH aus dem Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) (Boron, 2005). Dieses entfaltet seine Wirkung hauptsächlich im CD des distalen Nephrons, wo es über eine gesteigerte Wasserpermeabilität für eine Wasser-Retention und Konzentrierung des Urins sorgt (Knepper and Inoue, 1997, Boron, 2005). Außerdem fördert es sowohl in der Henle'schen-Schleife als auch in den Hauptzellen des CDs die Na^+ -Resorption (Saritas et al., 2013), indem es z.B. die Anzahl der offenen Na^+ -Transporter in der apikalen Zellmembran der Hauptzellen des CDs erhöht. Somit kommt es durch die ADH-vermittelte Wirkung in der Niere zu einer Erhöhung des EZVs (Boron, 2005). Nicht nur über ihren Einfluss auf den Na^+ -Haushalt und das EZV, sondern auch als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems,

leistet die Niere einen entscheidenden Beitrag in der mittleren- und längerfristigen Blutdruckregulation.

1.4. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Sinkt z.B. in Folge einer Hypovolämie der mittlere Blutdruck in den Nierenarterien, so kommt es zu einer Freisetzung des proteolytischen Enzyms Renin aus den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates in den systemischen Kreislauf. Dort spaltet es das in der Leber synthetisierte Angiotensinogen zu Angiotensin I, aus welchem wiederum durch eine enzymatische Hydrolyse durch das hauptsächlich in der Lunge befindliche Angiotensin-converting enzyme (ACE) das aktive Oktapeptid Angiotensin II gebildet wird. Angiotensin II wirkt stark vasokonstriktorisch, was durch eine Erhöhung des TPR zu einer mittelfristigen Erhöhung des Blutdruckes beiträgt. Zusätzlich fördert es die vermehrte Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (NNR) und von ADH aus der Neurohypophyse (Klinke, 2010). Dies führt schlussendlich zu einer Erhöhung des EZVs (Penton et al., 2015, 1.3.).

Im sogenannten Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN), welches sich aus dem DCT2, CNT und dem CD zusammensetzt (Penton et al., 2015), kommt der zur Kernrezeptorfamilie gehörige Aldosteron-Rezeptor (Mineralocorticoid-Rezeptor (MR)(NR3C2)) vor. Dieser ligandenaktivierte Transkriptionsfaktor gelangt nach der Bindung von Aldosteron am MR in den Zellkern, wo es entweder zu einer Transkription oder Repression der entsprechenden Zielgene kommt (Arroyo et al., 2011, Pascual-Le Tallec and Lombes, 2005, Terker and Ellison, 2015, Amazit et al., 2015, Boron, 2005). Im ASDN wird durch Aldosteron eine vermehrte Transkription der Na^+/K^+ -ATPase, der α -Untereinheit des ENaCs und der Serum- und Glucocorticoid-regulierten Kinase (Sgk1) hervorgerufen. Die Sgk1 inhibiert durch Phosphorylierung die Ubiquitin Ligase Nedd4-2 und vermindert dadurch den Nedd4-2-vermittelten ENaC-Abbau. Über die vermehrte Genexpression und den verminderten Abbau wird die Dichte des ENaCs an der apikalen Zelloberfläche erhöht. Zusätzlich bewirkt Aldosteron eine Erhöhung der ENaC-Offenwahrscheinlichkeit (Bianchi et al., 2015, Debonneville et al., 2001, Nishimoto and Fujita, 2015, Ueda et al., 2014). Dadurch induziert Aldosteron im ASDN eine vermehrte Na^+ -Resorption, was mit einer gesteigerten Wasser-Retention

und Erhöhung des EZVs einhergeht. Aldosteron ist damit ein wichtiges Hormon, was über die Regulation der renalen Na^+ -Retention zur langfristigen Blutdruckregulation wesentlich beiträgt (Penton et al., 2015, Terker and Ellison, 2015).

Darüber hinaus ist Aldosteron auch für den K^+ -Haushalt von großer Bedeutung. So wird es auch unabhängig von Angiotensin II bei steigender Plasma $[\text{K}^+]$ aus der NNR ausgeschüttet. Durch die oben beschriebene Aldosteron-induzierte, ENaC-vermittelte Na^+ -Retention entsteht ein größeres Lumen-negatives Potential, was eine gesteigerte apikale K^+ -Sekretion begünstigt. Zusätzlich sorgt es über einen vermehrten Einbau und eine verstärkte Aktivierung der apikalen K^+ -Kanäle ROMK und BK, für eine gesteigerte K^+ -Sekretion im ASDN und senkt somit die Plasma $[\text{K}^+]$ (Penton et al., 2015).

1.5. Das Aldosteron-Paradoxon

Zusammenfassend betrachtet, wird Aldosteron in zwei völlig unterschiedlichen physiologischen Situationen ausgeschüttet: zum einen während einer Hypovolämie und zum anderen während einer Hyperkaliämie. Interessanterweise sind die dabei beobachteten renalen Effekte von Aldosteron nicht identisch. Bei Hypovolämie bewirkt Aldosteron eine vermehrte Na^+ -Retention ohne gleichzeitige Erhöhung der K^+ -Sekretion. Dem gegenüber kommt es bei einer Hyperkaliämie zu einer Aldosteron-induzierten vermehrten K^+ -Sekretion ohne Na^+ -Retention. Diese unterschiedliche Wirkung des Aldosterons wird als Aldosteron-Paradoxon bezeichnet (Arroyo et al., 2011).

Betrachtet man die beiden physiologischen Zustände, die zur Aktivierung von Aldosteron führen genauer, so fällt auf, dass es bei einer Hypovolämie zur Freisetzung von Renin kommt. Die dadurch bedingte Erhöhung von Angiotensin II bewirkt eine Aktivierung des NCCs (durch NCC Phosphorylierung). Dies führt zu einer vermehrten elektroneutralen Rückresorption von NaCl und wirkt somit der Hypovolämie entgegen. Die durch Aldosteron aktivierten ENaC-Kanäle tragen in diesem Fall geringfügig zur NaCl-Rückresorption bei. Bei einer Hyperkaliämie kommt es nicht zur Aktivierung des RAASs, jedoch zu einer Angiotensin II-unabhängigen Freisetzung von Aldosteron aus der NNR. Ohne Angiotensin II Anstieg erfolgt somit keine Aktivierung des NCCs, jedoch eine Aldosteron-induzierte Aktivierung der ENaC-Kanäle. Dementsprechend

wird mehr Na^+ elektrogen über den ENaC resorbiert und es entsteht ein größeres Lumen-negatives Potential. Das Lumen-negative Potential fördert eine vermehrte K^+ -Sekretion und wirkt infolgedessen der Hyperkaliämie entgegen (Arroyo et al., 2011, Terker et al., 2015, Vitzthum et al., 2014). Die durch Aldosteron erhöhte Na^+ -Retention durch ENaC wird im Falle der Hyperkaliämie durch eine geringe Aktivität des NCCs ausgeglichen (Rengarajan et al., 2014). Aus diesem Grund wird bei Hyperkaliämie trotz Aldosteronanstieg keine vermehrte renale Na^+ -Retention beobachtet.

1.6. Bedeutung der Niere bei der Blutdruckregulation

Die funktionelle Relevanz der Niere und des RAASs für die Blutdruckregulation lässt sich sehr gut anhand von Krankheitsbildern darstellen. So konnte bei der Erforschung der Pathogenese der familiären hyperkaliämischen Hypertonie (FHHT, Pseudohypoaldosteronismus Typ II) ein regulatorisches Kinase-Netzwerk bestehend aus With-No-Lysine-Kinasen (WNKs), der Ste20p-related proline alanine-rich kinase (SPAK) und der oxidative stress response 1 Kinase (OxSR1) im ASDN entdeckt werden. Mutationen in diesem Netzwerk führen zum FHHT, die Niere verbleibt in einer „Einstellung“ und ist nicht mehr in der Lage sich an verschiedene physiologische Umstände anzupassen. Dabei kommt es durch eine permanente NCC-Aktivierung zu einem Salz-sensitiven Bluthochdruck (Hypertonie), einer Hyperkaliämie, einer metabolischen Azidose und einer Hypercalciurie, den typischen Symptomen der FHHT (Grimm et al., 2017). Im Gegensatz dazu kommt es beim Gitelman-Syndrom durch eine loss-of-function Mutation des NCCs zu einem Na^+ -Verlust mit niedrigem Blutdruck (Hypotonie), hypokaliämischer Alkalose und Hypocalciurie. Beim sogenannten Liddle-Syndrom entwickelt sich aufgrund einer gain-of-function Mutation des ENaCs eine Salz-sensitive Hypertonie mit gleichzeitiger hypokaliämischer Alkalose (Penton et al., 2015, Terker et al., 2015).

Diese genetischen Erkrankungen, die nur die renale Na^+ -Retention verändern, zeigen, dass die Niere eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Hypertonie einnimmt.

1.7. Volkskrankheit Hypertonie

Von einer Hypertonie spricht man, wenn systolische Blutdruckwerte größer gleich 140 mmHg (systolic blood pressure, SBP) und/oder diastolische Blutdruckwerte größer gleich 90 mmHg (diastolic blood pressure, DBP) gemessen werden (Mancia et al., 2013). Die Hypertonie führt über verschiedenste Prozesse wie z.B. endotheliale Veränderungen oder durch eine erhöhte Thrombogenität des Blutes zu strukturellen und funktionellen Schädigungen der Organe. Am Herzen äußert sich dieser, sogenannte Endorganschaden z.B. als Linksherzhypertrophie, welche in einer Herzinsuffizienz oder einem Herzinfarkt enden kann. Des Weiteren werden vor allem die Nieren, die Augen und die Gefäße geschädigt. Heutzutage gilt daher die Hypertonie als einer der größten Risikofaktoren für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen (Sunil et al., 2006, Abegaz et al., 2017). Im Jahr 2015 war in Deutschland mit 38,5% aller Sterbefälle eine Erkrankung des Kreislaufsystems die häufigste Todesursache (Bundesamt, 2017). Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie lag im Jahr 2008 in Deutschland bei Frauen um 20,7% und bei Männern um 31,1% (≥ 25 Jahren). Beim Vergleich der Industrienationen mit den Schwellen- und Entwicklungsländern fällt auf, dass die Hypertonie mittlerweile ein globales Gesundheitsproblem geworden ist. Gründe hierfür sind die zunehmende Veränderung der Essensgewohnheiten mit daraus resultierender und vermehrt vorkommender Adipositas und die schlechtere medizinische Versorgung der Bevölkerung in den Schwellen- und Entwicklungsländern (WHO, 2014). Mittlerweile geht man davon aus, dass weltweit 1 Milliarde Menschen an arterieller Hypertonie erkrankt sind (Abegaz et al., 2017). Zusätzlich geht die Volkskrankheit mit immensen Kosten einher. So wurden die durchschnittlichen jährlichen direkten und indirekten durch Hypertonie verursachten Kosten in den Vereinigten Staaten für die Jahre 2011 und 2012 mit 48,7 Milliarden US-Dollar beziffert. Tendenz stark steigend (Heidenreich et al., 2011, Mozaffarian et al., 2016). Die Festlegung aktueller Hypertonie-Zielwerte wird in den letzten Jahren stark diskutiert. So konnte die SPRINT-Studie eine Verringerung der Mortalität um 27% bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil entdecken, wenn eine aggressive Blutdrucksenkung mit einem Zielwert von kleiner 120 mmHg systolischem Blutdruck, im Gegensatz zum klassischen Zielwert von kleiner 140 mmHg, erreicht wurde (Group, 2015). Die aktuelle Leitlinie zur Therapie der Hypertonie der europäischen Gesellschaft für Hypertonie (ESH) und der europäischen

Gesellschaft für Kardiologie (ESC) lehnt jedoch eine aggressive Blutdrucksenkung weiterhin ab. Hauptkritikpunkt an der SPRINT-Studie ist die abweichende Blutdruckmessung, welche, im Vergleich zu vorigen Studien, Selbstmessungen der Patienten als Daten verwendete (Zanchetti et al., 2018).

Die Hypertonie kann wie oben beschrieben Folge einer genetischen Mutation sein, die eine vermehrte renale Na^+ -Retention verursacht. Allerdings ist das Krankheitsbild Hypertonie meist multifaktoriell bedingt und wird daher anhand ihrer Ursachen eingeteilt.

1.8. Ursachen der Hypertonie

Prinzipiell wird zwischen der primären (essentiellen) und der sekundären Hypertonie unterschieden. Bei der sekundären Hypertonie kann eine organische Ursache diagnostiziert werden. So kommt es z.B. bei einer Nierenarterienstenose durch den Blutdruckabfall in den nachfolgenden Gefäßen zur Ausschüttung von Renin und mittels Aktivierung des RAASs zu einer Hypertonie. Ebenso wäre ein primärer Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) aufgrund eines NNR-Adenoms als Ursache denkbar. Da die autonom erhöhte Aldosteronproduktion mit einer reflektorischen Inhibition der Reninausschüttung einhergeht, deutet ein erhöhtes Aldosteron-Renin-Verhältnis in der Diagnosestellung auf dieses Krankheitsbild hin (Monticone et al., 2015, Vilela and Almeida, 2017). Die sekundäre Hypertonie ist somit teilweise ursächlich therapierbar, macht aber mit einer Prävalenz von 5 – 10% nur einen vergleichbar kleinen Anteil der Hypertoniepatienten aus (Omura et al., 2004, Puar et al., 2016).

Im Gegensatz zur sekundären kann bei der primären Hypertonie keine reine körperliche Ursache des Bluthochdrucks festgestellt werden. Als Ursachen werden hierfür zu 30 - 40% genetische Dispositionen und zu 60 – 70 % Umweltfaktoren verantwortlich gemacht, die durch ein Zusammenwirken zu einer Hypertonie führen können. Dazu zählen z.B. Übergewicht, eine erhöhte Kochsalzzufuhr, Bewegungsmangel, Alkoholkonsum oder auch eine niedrige K^+ -Zufuhr. Eine genetische Disposition muss nicht mit der Entwicklung eines Bluthochdrucks einhergehen, sondern kann durch gesunden Lebensstil, mit ausgewogener Ernährung und ausreichend Bewegung, verhindert werden (Calhoun et al., 2008, Jahnsen, 2008).

1.9. Einfluss der Ernährung auf den Blutdruck

Eine Vielzahl an verschiedenen Ernährungsfaktoren beeinflusst den Blutdruck. So senken unter anderem eine Gewichtsabnahme, eine verminderte Kochsalz-Aufnahme, eine gesteigerte K^+ -Zufuhr oder eine Abnahme des täglichen Alkoholkonsums den Blutdruck (Appel et al., 2010). Hier kann die sogenannte „Dietary Approach to Stop Hypertension“ diet (DASH) hervorgehoben werden. Bei dieser Ernährungsform machen im Vergleich zur typischen amerikanischen Ernährung (Western diet) vermehrt Früchte, Gemüse und Milchprodukte mit geringem Fettanteil den Großteil der täglichen Mahlzeiten aus. Ebenso zählen Vollkornprodukte, Geflügel und Nüsse zu dieser Diät. Rotes Fleisch, Süßigkeiten und stark zuckerhaltige Getränke wie z.B. Softdrinks sind nur zu einem kleinen Teil vorgesehen. Insgesamt soll durch diese Ernährung weniger Fett und Cholesterin und dafür mehr K^+ , Magnesium (Mg^{2+}), Ballaststoffe und Proteine gegessen werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Diät sowohl bei einer hohen, durchschnittlichen oder niedrigen Na^+ -Zufuhr den Blutdruck (sowohl SBP als auch DBP) im Vergleich zu einer „Western diet“-Kontrollgruppe mit entsprechender Na^+ -Zufuhr signifikant erniedrigte. Jedoch war der Effekt bei hoher Na^+ -Zufuhr deutlich ausgeprägter als unter niedriger. Die größte Blutdruckabnahme konnte zwischen der „Western diet“-Kontrollgruppe mit einer hohen Na^+ -Zufuhr und der „DASH diet“-Gruppe mit einer niedrigen Na^+ -Zufuhr festgestellt werden (Sacks et al., 2001). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die „DASH diet“ in allen Hauptgruppen (weiblich, männlich, Hypertoniker und Nicht-Hypertoniker) einen blutdrucksenkenden Effekt besitzt. Dieser Effekt war vor allem bei Hypertonikern am stärksten ausgeprägt. Im Gegensatz dazu konnte bei Nicht-Hypertonikern nahezu kein blutdrucksenkender Effekt nachgewiesen werden (Appel et al., 2006). Es wird angenommen, dass ein Großteil des blutdrucksenkenden Effektes auf den hohen K^+ -Gehalt der „DASH diet“ zurückzuführen ist (Sacks et al., 2001).

1.10. Veränderte Ernährungsgewohnheiten und deren Einfluss auf den Blutdruck

Vergleicht man unsere heutige Ernährung (Western diet) mit der Ernährung unserer Vorfahren, so fallen gravierende Unterschiede auf. In den letzten 5.000 bis 10.000

Jahren wurden die Menschen sesshaft und begannen Ackerbau zu betreiben. Diese neuen Lebensumstände führten zu einer Änderung der Ernährungsgewohnheiten. Die Lebensmittel wurden vermehrt gekocht, was den K^+ -Gehalt und damit die K^+ -Zufuhr deutlich verringerte. So nahmen die Menschen zuvor noch viel K^+ (230 – 300 mmol/Tag) und wenig Na^+ (1 – 10 mmol/Tag) über die Nahrung zu sich. Die heutige K^+ -Zufuhr ist deutlich gesunken (70 – 80 mmol/Tag), wohingegen die Na^+ -Zufuhr stark angestiegen ist (150 – 200 mmol/Tag) (Penton et al., 2015). Man geht davon aus, dass die vermehrte Na^+ -Zufuhr ebenfalls mit Beginn des Ackerbaus und der Sesshaftigkeit einherging. Zum einen musste Nahrung mittels Kochsalzkonserverung länger haltbar gemacht werden, zum anderen konnten es sich immer mehr Menschen leisten ihre Speisen mit Salz zu würzen. Bis zum heutigen Tag hat sich somit die Zufuhr drastisch verändert. Diese in den letzten 10.000 Jahren geschehene Ernährungsumstellung war, im Vergleich zu anderen Säugetieren, für die menschliche Art einzigartig. Im Hinblick auf die Millionen Jahre dauernde evolutionäre Entwicklung der Säugetiere erfolgte diese außerdem relativ schnell. Man geht daher davon aus, dass der menschliche Organismus noch immer für eine K^+ -reiche und Na^+ -arme Ernährung ausgelegt ist. Dies könnte die Zunahme von Bluthochdruck und kardiovaskulären Erkrankungen unter der „Western diet“ erklären (Meneton et al., 2004, Terker et al., 2015, Singh et al., 1987).

1.11. Effekte einer hohen Kalium-Zufuhr auf den Blutdruck und die renale Natriumausscheidung

Schon 1928 vermutete der kanadische Arzt W.L.T. Addison, dass die damalige Ernährung mit wenig K^+ und viel Na^+ zu Bluthochdruck führen könnte. So beobachtete er an Hypertonikern, dass sich die Gabe von K^+ förderlich auf deren Blutdruck auswirkte (Addison, 1928). Seit Addisons Beobachtung sind mittlerweile eine Vielzahl epidemiologischer Beobachtungs- und Interventionsstudien an Menschen und Tieren mit unterschiedlichen K^+ -Diäten durchgeführt worden. So gehen einige von einer definitiven Verbindung zwischen der gestiegenen Prävalenz der Hypertonie und kardiovaskulären Erkrankungen und der modernen hoch Na^+ - und niedrig K^+ -Ernährung aus (Castro and Raij, 2013). Beispielsweise lassen zwei groß angelegte klinische Studien den Zusammenhang vermuten, dass sich eine niedrige K^+ -

Ernährung umgekehrt proportional zum MAP verhält (Mente et al., 2014, O'Donnell et al., 2014). Des Weiteren konnten Vitzthum et al. bei Mäusen einen Blutdruckanstieg unter hoch Na^+ - und niedrig K^+ -Zufuhr feststellen (Vitzthum et al., 2014).

Dem gegenüber fand sich bei Menschen mit einer gesteigerten K^+ -Ausscheidung über die Niere - was als Marker für eine ausreichende K^+ -Zufuhr benutzt wurde - ein deutlich niedriger arterieller Blutdruck. Auffällig war, dass vor allem anfällige Personen, wie z.B. Übergewichtige, alte Personen oder Hypertoniker scheinbar am meisten von dem blutdrucksenkenden Effekt einer K^+ -reichen Ernährung profitierten (Mente et al., 2014). So konnten auch epidemiologische Studien zeigen, dass sich eine hohe K^+ -Zufuhr positiv auf den Blutdruck auswirkt und das Risiko für hierdurch verursachte Komplikationen wie kardiovaskuläre Morbidität, Schlaganfälle und Mortalität an sich verringert (Aburto et al., 2013, O'Donnell et al., 2014).

Heute geht man davon aus, dass die vorteilhaften, blutdrucksenkenden Effekte einer hohen K^+ -Diät Ergebnis einer gesteigerten renalen Na^+ -Ausscheidung (Natriurese) und somit negativer Na^+ -Bilanz sind (Penton et al., 2016). So konnten Sorensen et al. zeigen, dass es bei Mäusen nach einer oralen K^+ -Gabe zu einer schnellen Kaliurese und Natriurese kam. Dies war der Fall, bevor es zu Veränderungen der Aldosteronlevel im Plasma kam. Zusätzlich konnte eine Dephosphorylierung des NCCs, was mit einer geringeren Aktivität des NCCs einhergeht, beobachtet werden (Sorensen et al., 2013). Ebenso konnte McDonough et al. auch an Ratten zeigen, dass es nach Steigerung der Plasma $[\text{K}^+]$ gleichermaßen zu einer Kaliurese und Natriurese und einer Abnahme des Phosphorylierungsgrades des NCCs kam (Rengarajan et al., 2014). Derzeit geht man davon aus, dass eine Steigerung der Plasma $[\text{K}^+]$ zu einer Aktivitätsabnahme des NCCs und somit zur Natriurese kommt. Das so vermehrt im Tubuluslumen verbleibende Na^+ kann dann im ASDN teilweise durch K^+ ausgetauscht werden. Hierdurch könnte die beobachtete Kaliurese erklärt werden (Sorensen et al., 2013, Rengarajan et al., 2014).

Nicht in allen Fällen scheint jedoch eine erhöhte K^+ -Zufuhr zur Senkung des Blutdrucks und zur vermehrten Na^+ -Ausscheidung zu führen. So fanden Vitzthum et al. bei Mäusen unter einer kombinierten hoch NaCl - (3%) und hoch K Citrat-Diät (5%) einen Blutdruckanstieg und eine gesteigerte Na^+ -Retention. Zusätzlich wurden eine Erhöhung der Plasma-Aldosteronkonzentration und eine verstärkte Proteinexpression von ENaC und Sgk1 nachgewiesen. Die Vermutung lag nahe, dass der

Blutdruckanstieg Folge einer vermehrten Aldosteron-induzierten Na^+ -Retention über den ENaC-Kanal war. Doch weder eine direkte Blockade des ENaCs durch Amilorid, noch eine Inhibierung des MRs anhand von Spironolacton konnten den Blutdruck normalisieren (Vitzthum et al., 2014). Böttcher (Böttcher, 2016) untersuchte, ob das zusätzlich vermehrt im Futter enthaltene Anion für den Blutdruckanstieg mitverantwortlich gemacht werden kann. Jedoch zeigte sich keine Abhängigkeit vom Anion. Alle Tiere, die neben einer Na^+ -reichen Diät noch eine hohe Gabe von KCl, KCitrat oder KHCO_3 erhielten, reagierten mit einem gleich hohen Anstieg des Blutdrucks. Ebenso wurde unter allen Diäten ein erhöhter Aldosteronspiegel im Plasma beobachtet. Unterschiede zwischen den Diäten zeigten sich jedoch hinsichtlich der Genexpression. So war z.B. der ENaC nur bei Gabe einer hoch KCitrat- oder hoch KHCO_3 -Diät vermehrt exprimiert, nicht jedoch nach Gabe einer hoch KCl-Diät. In den folgenden Abschnitten werden diese kombinierten hoch Kalium-/Natrium-Diäten abhängig vom zugegebenen Anion als hoch KCl-, KCitrat- oder KHCO_3 -Gruppe bezeichnet (siehe auch 2.2.2.).

1.12. Fragestellung

Da es unter einer hoch NaCl-Diät (3%) kombiniert mit entweder hoch KCl-, hoch KCitrat- oder hoch KHCO_3 -Diät (5%) jeweils zur Erhöhung der Aldosteronkonzentration und zum Blutdruckanstieg kam, dieser jedoch mit unterschiedlicher Expression renaler Na^+ -Transporter und -Kanäle einherging (Vitzthum et al., 2014, Böttcher, 2016), stellten sich folgende Fragen:

Welche Mechanismen führen zum beobachteten Blutdruckanstieg bei den unterschiedlichen hoch K^+ -Diäten (KCl, KCitrat und KHCO_3), wenn diese mit einer hoch NaCl-Diät kombiniert werden?

1. Führen die unterschiedlichen hoch K^+ -Diäten unabhängig vom Anion zu einer Na^+ -Retention und somit zu einer Plasmavolumenexpansion?

Hierzu wurde das Plasmavolumen anhand der Indikatorverdünnungsmethode, der Hämatokrit im Rahmen einer Blut-Gas-Analyse und die ANP-Konzentration im Plasma mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Da

Plasmavolumenänderungen auch zu einer Änderung der GFR führen können, wurden diese unter den kombinierten hoch Na^+ / K^+ -Diäten ebenfalls ermittelt. Ebenso wurde die renale Na^+ -Retention am 6. und 10. Tag der Diät durch Bestimmung des Na^+ - und Kreatinin-Konzentrations-Verhältnisses ($[\text{Na}^+]/[\text{Crea}]$) in Mäuse-Urin erhoben.

2. Zeigen sich aufgrund der unterschiedlichen Anionen der verschiedenen hoch K^+ -Diät-Gruppen (2.2.2.) Unterschiede im Säure-Base-Haushalt der Tiere und hat dies einen Einfluss auf die Na^+ -Homöostase?

Da in den drei hoch Kalium-Gruppen der ENaC unterschiedlich exprimiert wurde, wurde mit Hilfe einer Blut-Gas-Analyse untersucht, ob in den Diätgruppen eine Störung des Elektrolythaushaltes zu beobachten ist. Zusätzlich wurde der Säure-Base-Status für die unterschiedlichen Tiere erfasst, da HCO_3^- den ENaC direkt aktivieren kann (Pech et al., 2010).

3. Ist ein Anstieg der Herzfrequenz (HF) ursächlich für den Blutdruckanstieg?

Da in der hoch KCl-Gruppe keine vermehrte Expression des ENaCs, keine Na^+ -Retention und keine EZV-Expansion beobachtet werden konnte, wurde eine Herzfrequenzsteigerung als Ursache des beobachteten Blutdruckanstiegs unter der kombinierten hoch NaCl- (3%) hoch KCl (5%)-Diät in Betracht gezogen und die Herzfrequenz untersucht.

4. Welche Auswirkung hat eine Blockade des MRs auf den Blutdruck der Mäuse in der hoch KCl-Gruppe?

Da es auch in der hoch KCl-Gruppe zu einem Blutdruckanstieg und einer Erhöhung der Aldosteronkonzentration kam, wurde mithilfe des Mineralocorticoid-Rezeptorblockers Spironolacton versucht, den Blutdruck wieder zu normalisieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien/Lösungen

FITC-Sinistrin (2,5mg/ 100µl pro 30g KG) (LOT: VE17140512S) (*Fresenius Kabi AG*)

Ethanol (*Merck*)

EDTA (*Merck*)

Evans Blue (*Sigma*)

Millipore-H₂O

Axon Control N Kontrollserum (*Axonlab*)

SPOTCHEM™ Referenzlösung (*Arkray, Inc.*)

Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (*B.Braun Melsungen AG*)

Iod Desinfektionsmittel

Aprotinin-Lösung (*Sigma*)

ANP-Elisa (*Phoenix Pharmaceuticals, Inc. #EK-005-24*)

Reflotron® Precinorm U (*Roche Diagnostics GmbH*)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Doppelseitige Klebestreifen für GFR Sensor

Pflasterrolle Transpore™ (*3M™*)

Eppendorf Cups 0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml (*eppendorf AG*)

Falcontubes 15 ml (*Sarstedt*)

Einmal-Injektions-Kanüle Sterican® (30G ½“ 0,3 x13 mm) (*B.Braun Melsungen AG*)

Spritze Omnifix®-F (*B.Braun Melsungen AG*)

Glaskapillare (*Hirschmann Laborgeräte; Kapillaren Schmelzpunktbestimmung 9201075, AD 1,0 LG 75mm*)

Li-Heparin Röhrchen Micro Tube 1,3 ml LH (*Sarstedt*)

Pipettenspitzen (*Greiner Bio One International GmbH*)

SPOTCHEM™ E-Plate Na, K, Cl (*Arkray, Inc.*)

Combur³-pH-Teststreifen® (*Roche*)

pH Indikatorpapier (*MERCK*)

safeCLINITUBES electrolyte balanced (*Radiometer Medical ApS*)

Clot catcher (*Radiometer Medical ApS*)

Kalium-EDTA-Röhrchen (*Sarstedt*)

Reflotron® Creatinine Teststreifen (*Roche Diagnostics GmbH*)

Reflotron® Pipette (*Roche Diagnostics GmbH*)

2.1.3. Medikamente/Cremes

Isofluran (Forene®) (*AbbVie Deutschland GmbH&Co. KG*)

VEET-sensitive Enthaarungscreme (*Reckitt Benckiser*)

Xylazin (Rompun® 2%) Injektionslösung (*Bayer Vital GmbH*)

Ketamin (*Albrecht GmbH*)

Enrofloxacin (Baytril®) Injektionslösung (*Bayer Vital GmbH*)

Carprofen (Rimadyl®) Injektionslösung (*Pfizer GmbH*)

Novaminsulfon-ratiopharm® (*ratiopharm GmbH*)

Glucose 5% (*B.Braun Melsungen AG*)

Natriumcyclamat (süssli®) Süßstofftabletten (*Nutrisun GmbH&Co.KG*)

Spirolacton-Pellet (*Innovative Research of America*)

2.1.4. Geräte

Isofluran Vet.-Med. Vapor (*Drägerwerk Lübeck AG*)

Wärmeplatte Exatherm U3 electronic (*julabo*)

Elektrischer Rasierapparat Model 2000AD (*Thrive®*)

GFR-Sensor mit USB-Connector und Lithium-Ionen-Batterie (*Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH*)

Vortexer: MS2 Minishaker (*IKA®*) Reax 1 (*Heidolph*)

Schwanenhalsleuchte KL 1500 LCD (*Leica*)

Centrifuge 5417R (*ependorf AG*)

Multiskan FC (*Thermo Scientific*)

Messwaage Toledo Excellence Plus XP1202s (*Mettler*)

Messwaage Excellence (*Sartorius*)

Spotchem™ ELSE-1520 (*Axonlab*)

Spotchem™ Doppelpipette (*Axonlab*)

Handrefraktometer (*Müller*)

Metabolische Käfige (*Techniplast®*)

Telemetriesender Chronic Use TA11PA-C10 Implant (*Firma DSI™*)

Telemetrie-Empfängerplatten PhysioTel™ Receiver (*Firma DSI™*)

BGA-Gerät Radiometer ABL90 FLEX SERIE (*Radiometer Medical ApS*)

Reflotron® (*Roche Diagnostics GmbH*)

2.1.5. Software

Programm Intelligent Plaster Version 1.0RC3

Dataquest A.R.T.™ Gold Acquisition (V 4.31, *Data Sciences International*)

Dataquest A.R.T.™ Gold Analysis (V 4.31, *Data Sciences International*)

GraphPad Prism[®] (Version 5.02)

G*Power (Version 3.1.9.2)

Microsoft[®] Word 2010 (Version 14.0.7140.5002) (*Microsoft[®] Corporation*)

Microsoft[®] Excel 2010 (Version 14.0.7140.5002) (*Microsoft[®] Corporation*)

Microsoft[®] PowerPoint 2010 (Version 14.0.7140.5002) (*Microsoft[®] Corporation*)

2.1.6. Versuchstiere

Mäuse C57bl6 zwischen 19 bis 23 Gramm (*Charles River Laboratories International, Inc.*)

2.1.7. Futter

Basisfutter (*ssniff[®] Spezialitäten GmbH*)

Diätfutter (*ssniff[®] Spezialitäten GmbH*)

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche C57bl6 Mäuse von Charles River verwendet. Zu Beginn der verschiedenen Versuche wogen diese zwischen 19 und 26 Gramm. Die Tiere waren in einem klimatisierten Raum bei durchschnittlich 22°C und 55% Luftfeuchtigkeit untergebracht und hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter.

Die Genehmigungsnummer für die Durchführung der Versuche lautet 41/14. Alle tierschutzrelevanten Eingriffe wurden von Dr. Vitzthum und Dr. Seniuk durchgeführt.

2.2.2. Basis- und Diätfutter

Die Fütterung erfolgte in Pelletform (Ausnahme: siehe 2.2.8. Metabolischer Käfig) mit Basis- oder Diätfutter der Firma ssniff®. Das Basisfutter enthielt 0,93% K⁺ und 0,24% Na⁺ und wurde vor bzw. zwischen den jeweiligen Versuchen den Tieren als Basisdiät gegeben. Für die Gabe des Diätfutters wurden die Tiere zufällig in die unterschiedlichen Gruppen eingeteilt. Das Diätfutter wurde stets für zehn Tage verabreicht.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der sechs verwendeten Diäten. Es wurden stets kombinierte Kalium/Natrium-Diäten eingesetzt.

Normal Kalium-Gruppen			Hoch Kalium-Gruppen		
Normal KCl-Gruppe	Normal KCitrat-Gruppe	Normal KHCO ₃ -Gruppe	Hoch KCl-Gruppe	Hoch KCitrat-Gruppe	Hoch KHCO ₃ -Gruppe
0,93% Kaliumchlorid (KCl),	0,93% Kaliumcitrat (KCitrat),	0,93% Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃),	5% Kaliumchlorid (KCl),	5% Kaliumcitrat (KCitrat),	5% Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃),
3% Natriumchlorid (NaCl)	3% Natriumchlorid (NaCl)	3% Natriumchlorid (NaCl)	3% Natriumchlorid (NaCl)	3% Natriumchlorid (NaCl)	3% Natriumchlorid (NaCl)

Tabelle 1: Die in den Versuchen verwendeten Diäten.

Alle Tiere, die eine 0,93% K⁺-Diät in Kombination mit 3% NaCl-Diät erhielten, wurden als normal Kalium-Gruppe bezeichnet. Alle Tiere, die eine 5% K⁺-Diät in Kombination mit 3% NaCl-Diät erhielten, wurden als hoch Kalium-Gruppe bezeichnet. Die verschiedenen Diäten enthielten alle die gleiche Menge an Proteinen, Kohlenhydraten

und Fetten. Sie unterschieden sich folglich nur hinsichtlich ihres Kaliumgehaltes und anhand der zugegebenen Anionen. Der Natriumchlorid-Gehalt war in allen sechs Kombinations-Diäten mit 3% NaCl gleich hoch.

2.2.3. Versuchsgruppen

Verschiedene Mausgruppen durchliefen unterschiedliche Versuche.

2.2.3.1. Metabolischer-Käfig-Gruppe (Tier MK1-60):

Diesen Tieren wurde am Tag vor dem 24-stündigen Aufenthalt im metabolischen Käfig zusätzlich zu dem Pelletfutter Mehlfutter angeboten, um die Tiere an das Mehlfutter zu gewöhnen. Am 9. Tag der Diät wurden die Tiere für 24 Stunden in die metabolischen Käfige gesetzt (2.2.8). Anschließend wurde bei den Tieren retrobulbär Blut entnommen um eine BGA-Analyse durchzuführen (2.2.6) und um Plasma (Li-Heparin) zu gewinnen. Nachdem die Tiere durch zervikale Dislokation getötet wurden, wurden Herz und Nieren entnommen und die Tibialänge bestimmt.

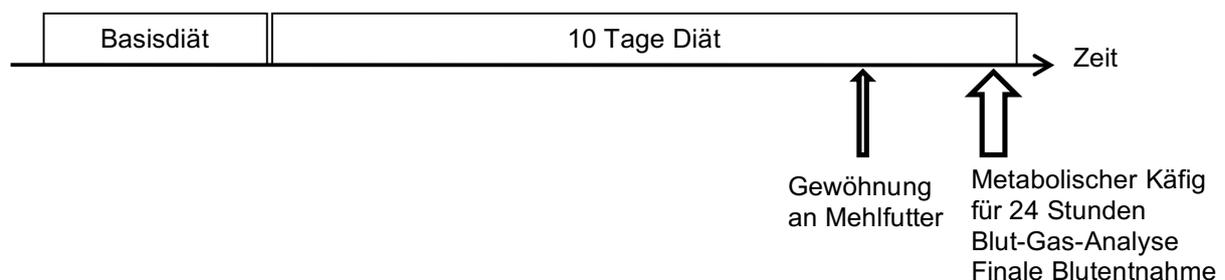


Abb. 3: Zeitstrahl der Versuche in der Metabolischer-Käfig-Gruppe.

2.2.3.2. Plasmavolumen-Gruppe (Tier PV1-47):

Bei diesen Tieren wurde sowohl vor dem Beginn der Diät (Basis-GFR-Messung) als auch während der Diät (Diät-GFR-Messung am 9. Tag) eine GFR-Messung durchgeführt (2.2.7). Am letzten Tag der Diät wurde das Plasmavolumen mittels Indikatorverdünnungsmethode bestimmt (2.2.4). Nachdem die Tiere durch zervikale Dislokation getötet wurden, wurden Herz und Nieren entnommen und die Tibialänge bestimmt.

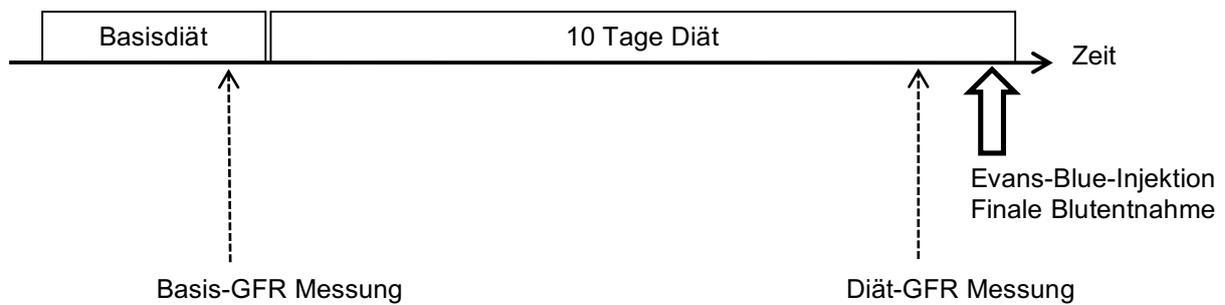


Abb. 4: Zeitstrahl der Versuche in der Plasmavolumen-Gruppe.

2.2.3.3. ANP-Gruppe (Tier ANP1-48):

Am 6. Tag der Diät wurden die Mäuse für vier Stunden in einen metabolischen Käfig gesetzt (2.2.8), um Urin für die Bestimmung von Kreatinin und Elektrolyten zu erhalten (2.2.9 und 2.2.10). Am 10. Tag der Diät erfolgte bei den Tieren eine retrobulbäre Blutentnahme zur Durchführung einer BGA (2.2.6) und zur Gewinnung von Plasma (K-EDTA/Aprotinin) für die ANP-Bestimmung (2.2.5). Zusätzlich wurde eine Blasenpunktion zur Uringewinnung durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

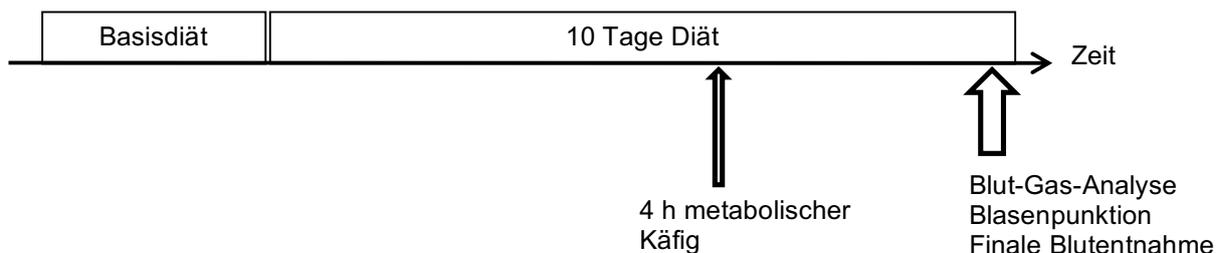


Abb. 5: Zeitstrahl der Versuche in der ANP-Gruppe.

2.2.3.4. Telemetrie-Gruppe (Tiere T01-T26):

Frühestens 14 Tage nach der Telemetrie-OP (2.2.12.) wurde mit der ersten Basis-Blutdruckmessung (2.2.13) unter Basisdiät (0,93% K⁺; 0,24% Na⁺) begonnen. Die Basismessung erfolgte für 60 Stunden stets unmittelbar vor Beginn der entsprechenden kombinierten Kalium/Natrium-Diät. Eine wiederholte 60-stündige Blutdruckmessung wurde am 7. Tag der Diät gestartet und endete am 10. Tag der Diät. Bei manchen Mäusen wurde einen Tag vor Diätstart ein Spironolacton-Pellet implantiert (2.2.14). Nach der erneuten Blutdruckmessung am Ende der Diät wurde das Spironolacton-Pellet entfernt. Abhängig von der Senderfunktion wurden mehrere

verschiedene Diäten mit oder ohne Spironolacton-Pellet an einer Maus durchgeführt. So erhielten die Tiere nach einer Pause von mindestens 28 Tagen unter Basisdiät nochmals eine der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Für die Blutdruck-Auswertung wurde die erste unter Basisdiät gemessene Blutdruckmessung als Basis verwendet.

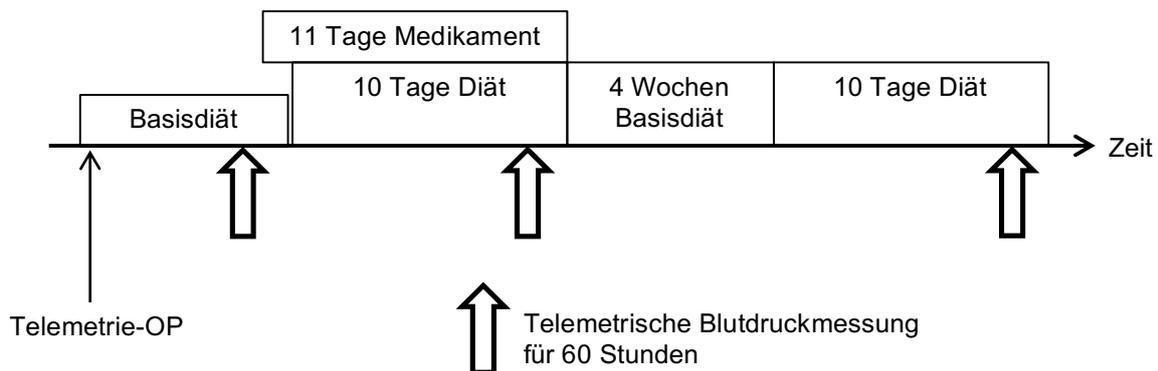


Abb. 6: Zeitstrahl der Versuche in der Telemetrie-Gruppe.

2.2.4. Bestimmung des Plasmavolumens mittels Indikatorverdünnungsmethode:

Bei diesem Verfahren wurde die Verteilungseigenschaft von Evans Blue ausgenutzt, da sich dieses nur im Plasmavolumen und in sonst keinem der weiteren Kompartimente des Körpers verteilt. Anhand der Verdünnung einer bekannten Menge Evans Blue konnte das tatsächliche Plasmavolumen ermittelt werden. Die Maus wurde zunächst in einer Kammer mit Isofluran narkotisiert und anschließend auf eine Wärmeplatte mit Isofluran-Atemmaske gelegt. Die inhalative Narkose wurde über den kompletten Zeitraum des Versuches durchgeführt. Nach Erlöschen des Zehenzwischenreflexes wurden der Maus mit einer Kanüle (30G ½“ 0,3 x13 mm) 100 µl (50 µg/100µl) Evans Blue retrobulbär in den dort liegenden Venenplexus appliziert. Um eine komplette Verteilung des Farbstoffes in der Maus zu gewährleisten wurde erst nach 10-minütiger Wartezeit die retrobulbäre, finale Blutentnahme in ein Li-Heparin Röhrchen am kontralateralen Auge durchgeführt. Die Tiere wurden daraufhin durch eine zervikale Dislokation getötet. Das Blut wurde bei 2000 rpm zentrifugiert und daraufhin das Plasma abpipettiert. Abhängig von der erhaltenen Blutmenge wurden 150 µl und/oder 200 µl Plasma für eine Extinktionsmessung verwendet. Diese wurde mit dem Multiskan FC bei 620 nm und nach fünf-sekündigem Schütteln durchgeführt. Zwei zuvor erstellte Eichkurven (eine für die jeweils verwendete Plasmamenge) lieferten die für die Bestimmung des Plasmavolumens benötigten Formeln:

- Regressionsgerade der 150µl-Probe: $f(x) = 0,02555 * x + 0,0746$
- Regressionsgerade der 200µl-Probe: $f(x) = 0,03255 * x + 0,1912$

f = Extinktion x = Plasmavolumen

Von dem hieraus errechneten Plasmavolumen wurden noch die injizierten 100 µl Evans Blue abgezogen.

2.2.5. ANP-Bestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) wurde den Tieren (ANP1-48) am 10. Tag der Diät mittels Glaskapillare retrobulbär Blut in ein Kalium-EDTA-Röhrchen (*Sarstedt*) entnommen. Dieses war zuvor mit 5 µl einer 0,1 TIU/µl Aprotinin-Lösung (*Sigma*) befüllt worden, um jegliche Peptidasen zu blockieren, welche das ANP abbauen würden. Das Blut wurde bei 2000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei minus 20°C gelagert. Als nächstes wurde das Plasma mit Assay Puffer verdünnt (1:2). Pro Bestimmung wurden 50 µl verdünntes Plasma eingesetzt und der ANP-Elisa (Phoenix Pharmaceuticals #EK-005-24) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.6. Blut-Gas-Analyse (BGA)

Um den Säure-Base-Status und die Plasma-Elektrolytkonzentrationen der Tiere unter kombinierter Kalium/Natrium Diät zu untersuchen, wurde eine Blut-Gas-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde am letzten Tag der Diät den Tieren (MK1-60 und ANP1-48) unter Isofluran-Narkose retrobulbär Blut entnommen. Das in den BGA-Kapillaren (electrolyte balanced) aufgenommene Blut wurde sofort in das BGA-Gerät (Radiometer ABL90 FLEX SERIE) eingeführt, welches daraufhin automatisch mit der Messung begann. Die Ergebnisse wurden mittels USB-Stick auf einen PC übertragen und dort ausgewertet.

2.2.7. Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR):

Mithilfe des NIC-Kidney (Non-invasive-Clearance) Verfahrens der Firma Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH konnte die GFR mithilfe eines Sensors mehrfach an einer Maus transkutan gemessen werden. Ein Tag vor der eigentlichen GFR-Messung wurde unter leichter Isofluran-Narkose eine ca. 1x2 cm große Stelle auf dem Rücken der Maus rasiert und anschließend mit VEET-sensitive Enthaarungscreme (*Reckitt Benckiser*) enthaart. Die Creme wurde mit Wattestäbchen entfernt. Zusätzlich wurde, um eine Hautreizung zu verhindern, die enthaarte Stelle mit feuchten Tüchern abgewaschen und trocken getupft (Abb. 7).



Abb. 7: Inhalativ narkotisierte Maus nach erfolgter Rasur.

Am nächsten Tag wurde unter erneuter Isofluran-Narkose den Mäusen mit einem Spezialpflaster der Sensor auf die enthaarte Stelle geklebt. Zuvor wurde der Sensor mit der entsprechenden Lithium-Ionen-Batterie verbunden, um die Messung zu starten. Ein zusätzlicher Streifen Transpore™, welcher um die Apparatur und um die gesamte Maus gewickelt wurde, vermied ein Abrutschen oder Lösen des Sensors von der Haut (Abb. 8). Anschließend wurde die Maus unter anhaltender Narkose zwei Minuten ohne Bewegung liegen gelassen. In dieser Zeit wurde das Hintergrundsignal der Haut gemessen, was später als Baseline in die Auswertung der Daten einging. Daraufhin wurde eine gewichtsadaptierte Menge FITC-Sinistrin Lösung (2,5mg/ 100µl pro 30g Körpergewicht) mit einer geeigneten Kanüle (30G ½“ 0,3 x13 mm) retrobulbär injiziert. Der Sensor bestand aus zwei LEDs und einer Photodiode und erfasste damit die zeitliche Dynamik der FITC-Sinistrin-Konzentration im Blut durch die Haut. Die

Tiere wurden in ihre Käfige (ohne cage enrichment) zurückgesetzt. Dort erwachten sie aus der Narkose und konnten sich uneingeschränkt in ihrem Käfig bewegen.



Abb. 8: Inhalativ narkotisierte Maus mit angebrachtem GFR-Sensor.

Mindestens sechzig Minuten nach erfolgter Injektion wurde der Sensor unter erneuter, kurzer Isofluran-Narkose entfernt. Die Maus wurde in ihren Originalkäfig (mit cage enrichment) zurückgesetzt. Danach wurde der Sensor per USB mit einem PC verbunden und die Daten mit dem Programm Intelligent Plaster Version 1.0RC3 ausgewertet. Das Programm stellte die Messdaten anhand einer Fluoreszenz-/Zeit-Kurve dar. Durch markieren der Baseline, des Startzeitpunktes „t = 15 Minuten nach Injektion“ und des Endzeitpunktes „t = 45 min nach Injektion“ errechnete das Programm die Halbwertszeit für FITC-Sinistrin (Abb. 9).

Im angehängten User Manual fand sich eine Tierart spezifische Konstante, welche durch die gemessene Halbwertszeit geteilt werden musste. Hieraus ergab sich dann die gesuchte GFR.

Für die Maus galt demnach folgende Formel:

$$\text{GFR in } \mu\text{l/min/100g Bodyweight} = (14616,8 \mu\text{l/100gBW}) / \text{HWZ in min.}$$

In manchen Fällen wurde am Endzeitpunkt (t= 45 min) ein niedrigerer Fluoreszenzwert als die Baseline gemessen. In diesen speziellen Fällen wurde eine zweite Auswertung vorgenommen; es wurden die letzten zehn Minuten als neue Baseline gewählt und anschließend die GFR mit der neu erhaltenen HWZ berechnet. Aus den beiden unterschiedlichen GFR-Werten wurde der Mittelwert gebildet.

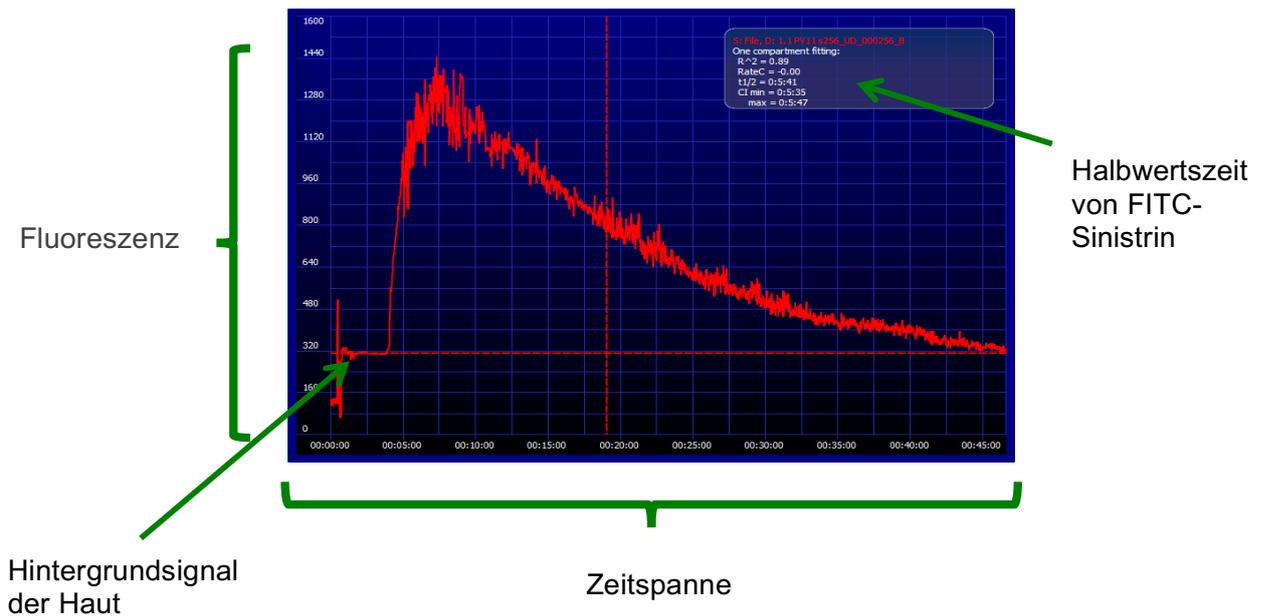


Abb. 9: Auswertung der Fluoreszenz-/Zeit-Kurve anhand des Programms Intelligent Plaster.

2.2.8. Metabolischer Käfig (4 und 24 Stunden)



Abb. 10: Metabolischer Käfig von Techniplast.

Um eine Bilanz hinsichtlich aufgenommener und ausgeschiedener Elektrolyt- und Wassermenge zu erstellen wurden metabolische Versuchskäfige benutzt. Mithilfe dieser Käfige konnten sowohl die ausgeschiedene Urin- und Kotmenge, als auch die Futter- und Wasseraufnahme des Tieres bestimmt werden. Die Tiere (MK1-60) saßen dafür auf einem Gitter, unter welchem ein Trichtersystem den Kot und Urin beim Durchfallen getrennt sammelte. Während des gesamten Versuches stand den Tieren ausreichend Wasser und Futter zur Verfügung. Da Mäuse dazu neigen, mit ihrem

normalen Futter große Krümel fallen zu lassen, wurde dieses in pulverisierter Form (Mehlfutter) angeboten. Hierdurch sollte eine Verunreinigung der gesammelten Urin- und Kotproben weitestgehend vermieden werden. Damit sich die Mäuse an das Mehlfutter gewöhnen konnten, wurde dieses ein Tag vor Versuchsbeginn in ihre normalen Käfige gestellt. Um die Bilanz erstellen zu können, wurden vor

Versuchsbeginn sowohl die aufgefüllten Wasser- und Futterbehälter als auch die noch leeren Urin-, Kot- und Wasserauffangbehälter gewogen. Am 9. Tag der Diät wurden die Mäuse gewogen und für genau 24 Stunden in den metabolischen Käfig gesetzt. Nach dieser Zeit wurden alle Mäuse, sowie alle Behälter erneut gewogen. Anschließend erfolgte bei den Tieren in tiefer Isofluran-Narkose eine retrobulbäre Blutentnahme mit nachfolgender zervikaler Dislokation. Die gewonnenen Urinproben wurden bei minus 20°C gelagert und anschließend analysiert. Anhand des 24-h-Sammelurins, sowie den ermittelten Werten für die Urinelektrolyt-, Plasmaelektrolyt-, Urinkreatinin- und Plasmakreatinin-Konzentration konnten Aussagen zur Elektrolytbilanz, glomerulärer Filtration und fraktionellen Elektrolyt-Ausscheidung gemacht werden.

Leider konnte durch den Einsatz von Mehlfutter die Verunreinigung des Urins nicht verhindert werden. Zusätzlich zeigten die Tiere sehr große interindividuelle Unterschiede bei der Nahrungs- und Wasseraufnahme. So stellten z.B. einige Mäuse nahezu komplett das Trinken ein, wobei Tiere derselben Gruppe außergewöhnlich viel tranken (Abb. 11). Aus diesem Grund zeigten sich sehr starke Schwankungen in den Versuchsergebnissen.

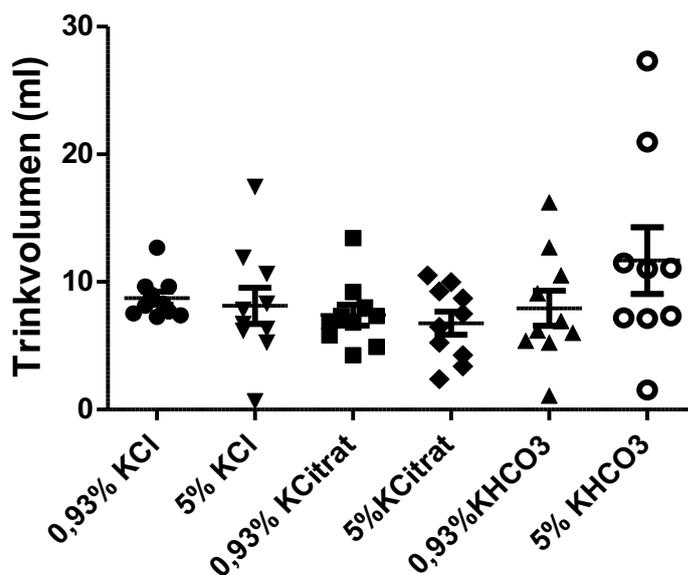


Abb. 11: Trinkvolumen der Tiere im 24 h metabolischen Käfig Versuch. Die Tiere zeigen ein individuell stark unterschiedliches Trinkverhalten. So konnte z.B. in der hoch (5%) KHCO₃-Gruppe eine Schwankung des Trinkvolumens von 1,5 ml bis 27 ml in 24 h beobachtet werden.

Aufgrund des unterschiedlichen Ess- und Trinkverhaltens der Mäuse (Abb. 11) wurde eine abgewandelte Vorgehensweise zur Bestimmung der renalen Elektrolyt-Ausscheidung gewählt. Die Tiere ANP1-48 wurden am 6. Tag der Diät für vier Stunden zur Uringewinnung in einen metabolischen Käfig gesetzt. Um in diesem Falle eine Verschmutzung durch Futter zu verhindern, wurde den Mäusen in diesen vier Stunden nur Wasser und kein Futter angeboten. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihre ursprünglichen Käfige gesetzt, wo sie wieder freien Zugang zu ihrem Futter hatten. Die Urinproben wurden abpipettiert und zur späteren Kreatinin- und Elektrolyt-Analyse bei minus 20°C eingefroren.

Zusätzlich wurde, um am 10. Tag der Diät von den Mäusen Urin zu erhalten, nach erfolgter zervikaler Dislokation und Eröffnung des Abdomens aus der Blase Urin entnommen. Der so gewonnene Urin wurde ebenfalls bei minus 20°C gelagert und anschließend analysiert. Die ermittelten Elektrolyt-Konzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatininkonzentration ([Crea]) in derselben Urinprobe ins Verhältnis gesetzt.

2.2.9. Elektrolytbestimmung in Urin und Plasma

Die Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentrationen wurden in allen Urin-, sowie Plasmaproben anhand des Gerätes Spotchem™ ELSE-1520 potentiometrisch bestimmt. Zunächst wurde dieses anhand einer Magnetkarte für die passende Chargennummer der verwendeten Messchips (Spotchem™ E-Plate Na, K, Cl) kalibriert. Zum Messen wurden mithilfe einer Doppelpipette gleichzeitig 22 µl Referenz- und 22 µl Probenlösung auf die entsprechenden Bereiche der Messplatten pipettiert. Nach Entfernen der Pipette zog das Gerät die E-Plate ein und begann mit der Messung. Anschließend wurden die ermittelten Elektrolyt-Konzentrationen protokolliert. Urinproben wurden mit Millipore-H₂O 1:8 verdünnt, Plasma wurde unverdünnt gemessen. Vor Beginn der Messung wurden zur Kontrolle des Geräts die Elektrolyt-Konzentrationen des Axon Control N Kontrollserums bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurde dieser Schritt nach ungefähr 20 Messungen und am Ende wiederholt.

2.2.10. Urinkreatinin

Die Urinkreatinin-Konzentration wurde mithilfe des Gerätes Reflotron® (*Roche Diagnostics GmbH*) analysiert. Dazu wurden die Urinproben der ANP-Gruppe (2.2.3.3.) mit isotoner Natriumchloridlösung (0,9%) 1:8 verdünnt und im Anschluss 32 µl der so verdünnten Urinprobe auf die Reflotron® Kreatinin-Teststreifen aufgetragen. Das in der Probe vorhandene Kreatinin startete eine chemische Reaktion an dessen Ende ein Indikator und Wasserstoffperoxid mittels einer Peroxidase zu einem Farbstoff umgewandelt wurden. Die Farbstoffextinktion wurde bei 642nm vom Gerät gemessen und in die vorliegende Kreatinin-Konzentration umgerechnet. Das Messergebnis wurde für alle Versuchstiere notiert. Vor Beginn der Messung und nach ca. 20 Messungen wurde das Gerät einer Qualitätskontrolle unterzogen, indem die Messung mit der Kontrolllösung Reflotron® Precinorm U (*Roche Diagnostics GmbH*) durchgeführt wurde. Die damit ermittelten Kreatinin-Konzentrationen mussten in dem vorgegebenen Bereich liegen, ansonsten wurde das Gerät gereinigt und eine erneute Kontrollmessung durchgeführt.

2.2.11. Bestimmung des spezifischen Gewichts von Urin

Der in den metabolischen Käfigen gesammelte 24-h-Sammelurin wurde gewogen. Daher musste das spezifische Gewicht des Urins bestimmt werden, um das gewünschte Urinvolumen berechnen zu können. Hierfür wurden ungefähr 20 µl unverdünnter Urin auf das Messprisma eines Handrefraktometers mit bekanntem Brechungsindex gegeben. Abhängig vom spezifischen Gewicht wird das einfallende Licht durch den Flüssigkeitsfilm auf dem Prisma abgelenkt. Je höher das spezifische Gewicht der Probe ist, desto größer ist die Ablenkung. Nach jeder Messung wurde das Messprisma gesäubert und die Bestimmung mit 1:8 verdünntem Urin/Millipore-H₂O wiederholt. Nach Berücksichtigung der Verdünnung wurde aus beiden Werten der Mittelwert gebildet und als spezifisches Gewicht in die Auswertung aufgenommen.

2.2.12. Operation des telemetrischen Blutdrucksenders

Um bei den Mäusen eine nahezu stressfreie Blutdruckmessung durchführen zu können, wurde ihnen von Dr. Anika Seniuk der Telemetriesender Chronic Use

TA11PA-C10 Implant der Firma DSI™ implantiert. Hierfür wurde die Maus zunächst durch intraperitoneale Gabe von *Rompun und Ketamin* anästhesiert. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde das Fell vom Unterkiefer bis zum Oberbauch rasiert. Als Prophylaxe wurde ein Antibiotikum (*Enrofloxacin 10 mg/kg*), ein Schmerzmittel (*Carprofen 5 mg/kg*) und 1 ml *NaCl-Glucose-Mischung (1:1)* subkutan gespritzt. Anschließend wurde die rasierte Fläche mit Iod-haltiger Lösung desinfiziert und vom Sternum bis submandibulär eine ventrale Inzision durchgeführt. Zwischen Vorder- und Hinterbeinen wurde unter dem Fell eine kleine Tasche präpariert. Als nächstes wurde die Gefäß-Nerven-Straße freipräpariert und die Arteria carotis communis von dieser getrennt. Mit einer Schnur wurde das Gefäß fixiert und der Katheter mittels abgeknickter Kanüle implantiert. Der Katheter wurde passend zur Tiergröße vorgeschoben und mithilfe der Schnur fixiert. Nach Senderkontrolle am PC wurden die Knoten gedoppelt und mit Kleber befestigt, der Sender selbst wurde in die vorgefertigte Tasche geschoben. Die Wunde wurde vernäht und das Tier in seinen Käfig gesetzt. Postoperativ stand der Käfig zur Hälfte auf einer Wärmeplatte, sodass die Maus zwischen dem erwärmten und dem kalten Käfigbereich frei wählen konnte. Sobald die Maus wach war, bekam sie eine Petrischale mit *NaCl-Glucose-Mischung (1:1)* und eine Schale mit durch Glucose-Lösung aufgeweichtem Futter. Zusätzlich hatte sie Zugang zu dem normalen Pelletfutter und zu Novalgin-haltigem Trinkwasser (40 Tropfen auf 500 ml mit Süßstofftabletten gesüßtem Wasser). In den darauffolgenden Tagen wurden die Nähte kontrolliert und ein weiteres Mal Schmerzmittel (*Carprofen 5 mg/kg*) und bei Bedarf Antibiotikum (*Enrofloxacin 10 mg/kg*) subkutan gespritzt.

2.2.13. Blutdruckmessung mittels Telemetriesender

Frühestens 14 Tage nach der Operation wurde mit der ersten Basismessung begonnen. Eine Messung startete immer abends um 19:00 Uhr und endete am dritten darauffolgenden Tag morgens um 07:00 Uhr. Dadurch wurden pro Messung 60 Stunden aufgezeichnet. Hierfür wurde der Sender durch einen Magneten aktiviert und die Daten telemetrisch über eine Empfängerplatte an einen PC gesendet. Es wurde in 5 Minuten Intervallen jeweils für 60 Sekunden mithilfe des Softwareprogramms DSI Dataquest ART Data Aquisition (V 4.0, Data Sciences International, Minnesota, USA) der mittlere arterielle Druck (MAP), der systolische Druck (SAP), der diastolische Druck

(DAP), die Herzfrequenz (HF), der Pulse pressure (PP) und die Aktivität aufgezeichnet. Ausgewertet wurden die Daten mittels DSI Dataquest A.R.T. Analysis (V 4.0, Data Sciences International, Minnesota, USA). Die gemessenen 12 Minutenwerte pro Stunde wurden gemittelt (Stundenwerte).

Für die Darstellung des Verlaufs des mittleren arteriellen Drucks (MAP) wurden die Stundenwerte verwendet. Für die Bestimmung des MAP_{night} oder der mittleren Herzfrequenz (HF_{night}) während der nächtlichen Aktivitätsphasen wurden die Stundenwerte zwischen 23:00 Uhr und 3:00 Uhr am 9. und 10. Tag der Diät gemittelt. Für die Auswertung des MAP_{day} oder der mittleren Herzfrequenz (HF_{day}) während der täglichen Ruhephase wurden die Stundenwerte zwischen 11:00 und 15:00 Uhr am 9. und 10. Tag der Diät gemittelt.

Um die Abhängigkeit des Blutdruckes von der Herzfrequenz zu untersuchen wurden die aufgezeichneten Minutenwerte verwendet. So lagen für jedes gemessene Minutenintervall ein HF- und dazugehöriger MAP-Wert vor. Die gemessenen Herzfrequenzen wurden in 8 verschiedene Intervalle gruppiert (Tabelle 2).

	Intervall	0	1	2	3	4	5	6	7
HF (beats/min)	von	200	401	451	501	551	601	651	700
	bis	400	450	500	550	600	650	700	1000

Tabelle 2: Die verschiedenen Herzfrequenz-Intervalle.

Die dazugehörigen MAP-Werte wurden jeweils für jedes HF-Intervall gemittelt und gegen die HF aufgetragen.

Die Abhängigkeit des MAP von der HF wurde sowohl für Tiere unter Basisdiät als auch für Tiere unter kombinierter Kalium/Natrium-Diät getrennt mithilfe von GraphPad Prism[®] ausgewertet.

2.2.14. Spironolacton-Pellet Operation

Da vermutet wurde, dass die erhöhte Aldosteronkonzentration die Ursache für den Blutdruckanstieg ist, wurde eine medikamentöse Blockade des Aldosteronrezeptors mithilfe von Spironolacton-Pellets durchgeführt. Hierfür wurden Tiere verwendet, bei denen bereits ein Telemetriesender implantiert worden war (2.2.12.). Für die Pellet

Operation wurden die Tiere durch eine Isofluran-Atemnarkose anästhesiert und bekamen ein Schmerzmittel (*Carprofen 5 mg/kg*) und ein Antibiotikum (*Enrofloxacin 10 mg/kg*) subkutan als Prophylaxe gespritzt. Anschließend wurden die Tiere im Nacken rasiert und die Haut mit Iod-haltiger Lösung desinfiziert. Dort wurde eine kleine Inzision durchgeführt und unter dem Fell bis zum Lendenbereich des Rückens eine kleine Tasche geformt. Hier wurde das Spironolacton-Pellet platziert. Die Wunde wurde vernäht und noch einmal mit Iod-haltiger Lösung desinfiziert. Am darauffolgenden Tag fand eine Nahtkontrolle mit erneuter subkutaner Gabe von Schmerzmittel (*Carprofen 5 mg/kg*) statt. Bei Bedarf wurde die Wunde erneut desinfiziert oder auch ein weiteres Mal Antibiotikum (*Enrofloxacin 10 mg/kg*) subkutan gespritzt. Nach elf Tagen Verweildauer wurde das Pellet operativ entfernt. Der Operationsablauf entsprach dem der ersten Operation.

2.2.15. Statistik

Die komplette statistische Auswertung der erhaltenen Daten wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism[®] (Version 5.02) gemacht.

Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der Student's t-Test verwendet. Im Falle der GFR- und HF_{night} -Auswertung konnte ein paired Student's t-Test verwendet werden, da es sich bei den Daten um Ergebnisse von denselben Tieren handelte.

Für die Auswertung des während der täglichen Ruhephase gemessenen mittleren arteriellen Drucks (MAP_{day}) und des während der nächtlichen Aktivitätsphase gemessenen mittleren arteriellen Drucks (MAP_{night}) wurde jeweils eine paired one-way ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls Post Hoc Test benutzt. Hierdurch konnte jeder der 3 mittleren MAP-Werte gesondert mit den anderen beiden mittleren MAP-Werten verglichen werden.

Im Falle der Auswertung für den Verlauf des MAP wurde eine paired two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post Hoc Test verwendet. Dieser lässt einen gesonderten Vergleich einer Diät mit allen anderen Diäten zu.

Für alle Auswertungen galt ein p-Wert <0,05 als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

Für die Versuche 3.1. bis 3.6. erhielten die Tiere eine 10-tägige, jeweils unterschiedlich kombinierte Kalium/Natrium-Diät (2.2.2. und Tabelle 3).

Normal Kalium-Gruppen			Hoch Kalium-Gruppen		
Normal KCl-Gruppe	Normal KCitrat-Gruppe	Normal KHCO ₃ -Gruppe	Hoch KCl-Gruppe	Hoch KCitrat-Gruppe	Hoch KHCO ₃ -Gruppe
0,93% KCl, 3% NaCl	0,93% KCitrat, 3% NaCl	0,93% KHCO ₃ , 3% NaCl	5% KCl, 3% NaCl	5% KCitrat, 3% NaCl	5% KHCO ₃ , 3% NaCl

Tabelle 3: Die in den Versuchen verwendeten Diäten.

3.1. Volumenexpansion

Der in den Mäusen unter kombinierter hoch Kalium/hoch Natrium-Diät beobachtete Blutdruckanstieg (1.11.) kann möglicherweise auf ein vergrößertes effektiv zirkulierendes Volumen und dem damit einhergehenden zunehmenden Schlagvolumen zurückgeführt werden. Um ein womöglich vergrößertes Plasmavolumen nachzuweisen, wurden unterschiedliche Methoden gewählt.

3.1.1. Plasmavolumen-Bestimmung

Bei den Tieren der PV-Gruppe (2.2.3.2.) wurde am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten das Plasmavolumen anhand der Indikatorverdünnungsmethode bestimmt.

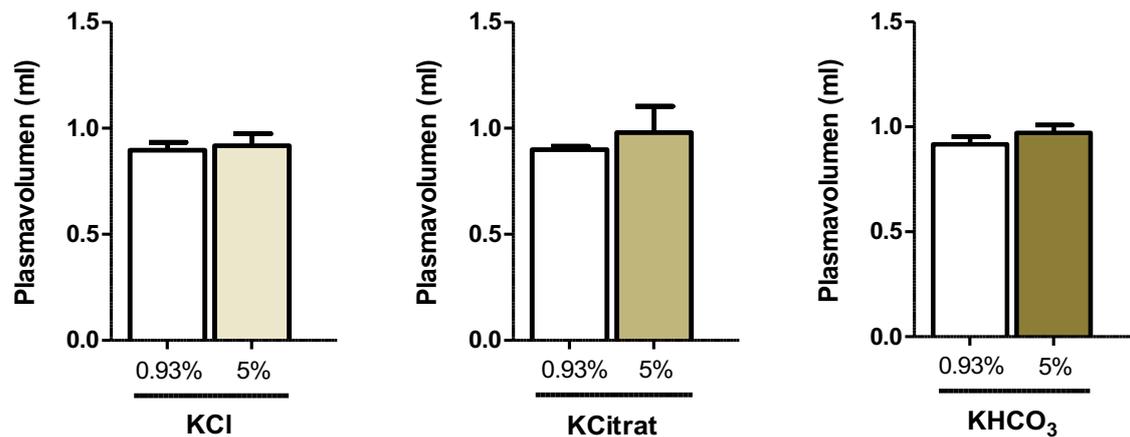


Abb. 12: Plasmavolumen am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen war eine signifikante Erhöhung des Plasmavolumens gegenüber den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe nachweisbar. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwerte \pm SEM, $n=5-8$ pro Gruppe, Student's t-Test).

Es ließen sich keine signifikanten Veränderungen des Plasmavolumens zwischen den hoch und normal Kalium-Gruppen der drei verschiedenen Kaliumsalze nachweisen (Abb. 12). Das mittlere Plasmavolumen in der hoch KCl-Gruppe betrug $0,92 \pm 0,06$ ml ($n=7$) und in der Vergleichsgruppe (normal KCl-Gruppe) $0,90 \pm 0,04$ ml ($n=8$). Für die Tiere der hoch KCitrat-Gruppe ergab sich ein mittleres Plasmavolumen von $0,98 \pm 0,12$ ml ($n=7$), für Tiere der normal KCitrat-Gruppe $0,90 \pm 0,02$ ml ($n=5$). Zwischen der hoch KHCO₃-Gruppe ($0,97 \pm 0,04$ ml, $n=7$) und der normal KHCO₃-Gruppe ($0,92 \pm 0,04$ ml, $n=7$) wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied gefunden.

3.1.2. Hämatokrit

Im Rahmen der BGA-Analyse der ANP-Tiere (2.2.3.3.) wurde der Hämatokrit bestimmt. Eine Vergrößerung des Plasmavolumens, bei gleichbleibender Zellzahl im Blut, sollte mit einer Abnahme des Hämatokrits einhergehen.

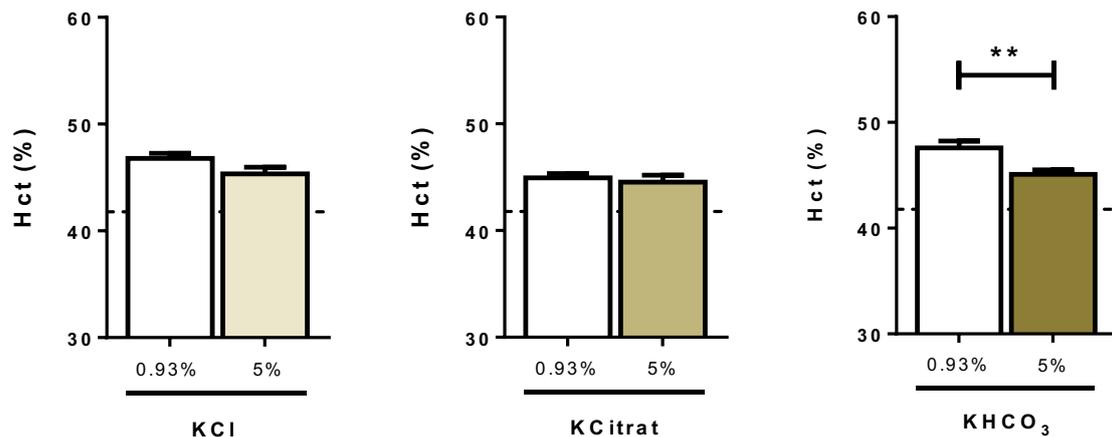


Abb. 13: Hämatokrit am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Beim Vergleich des Hämatokrits (Hct) der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe ließ sich nur in der KHCO₃-Gruppe eine signifikante Erniedrigung des Hcts nachweisen. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwert ± SEM, **p<0,01, n=6-8 pro Gruppe, Student's t-Test). Die gestrichelte Linie stellt den mittleren Hämatokrit von drei Tieren während der Basisdiät (0,93% K⁺; 0,24% Na⁺) dar.

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme (p<0,01) des Hämatokrits in der hoch KHCO₃ - (45,1 ± 0,4 %, n=8) verglichen mit der normal KHCO₃-Gruppe (47,6 ± 0,6 %, n=7). Zwischen der hoch KCl- (45,3 ± 0,6 %, n=8) und der normal KCl-Gruppe (46,8 ± 0,5%, n=8) und auch zwischen der hoch KCitrat- (44,6 ± 0,6%, n=8) und der normal KCitrat-Gruppe (44,9 ± 0,4%, n=6) fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 13).

3.1.3. Atriales natriuretisches Peptid (ANP)

Bei einer Plasmavolumenexpansion kann es durch eine vermehrte Vorhofdehnung zur Ausschüttung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) aus Vorhofmyocyten kommen. Die Bestimmung der ANP-Konzentration erfolgte mittels eines ELISA in den Plasmaproben der ANP-Tiere (2.2.3.3.), welche am 10. Tag der Diät gewonnen wurden.

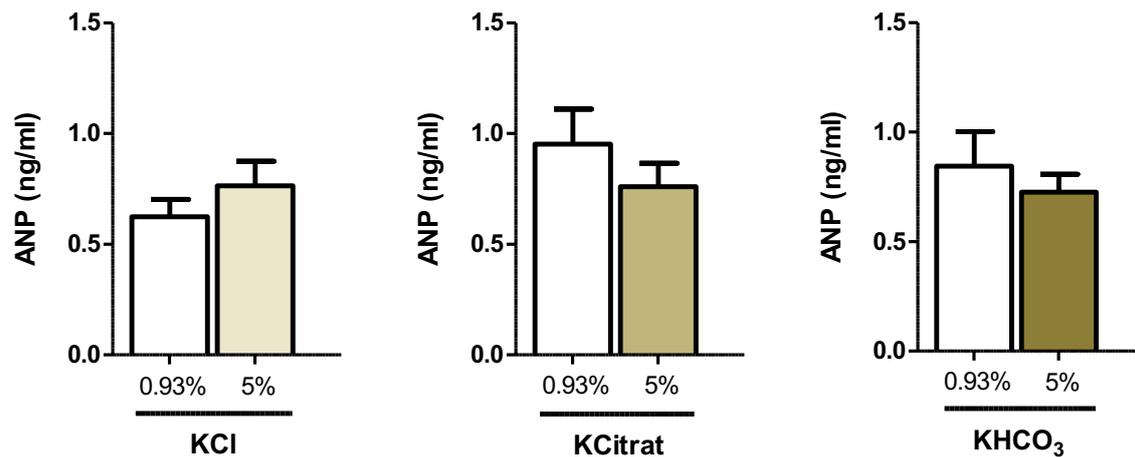


Abb. 14: ANP am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen war eine signifikante Erhöhung des ANPs gegenüber den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe nachweisbar. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwerte \pm SEM, n=7-8 pro Gruppe, Student's t-Test).

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ANP-Konzentration zwischen den hoch und normal Kalium-Gruppen der drei verschiedenen Kaliumsalze nachweisen (Abb. 14). Die mittlere ANP-Konzentration in der hoch KCl-Gruppe betrug $0,77 \pm 0,11$ ng/ml (n=8) und in der Vergleichsgruppe (normal KCl-Gruppe) $0,62 \pm 0,08$ ng/ml (n=8). Für die Tiere der hoch KCitrat-Gruppe ergab sich eine mittlere ANP-Konzentration von $0,76 \pm 0,11$ ng/ml (n=8), für die Tiere der normal KCitrat-Gruppe $0,95 \pm 0,16$ ng/ml (n=7). Zwischen der hoch KHCO₃-Gruppe ($0,73 \pm 0,08$ ml, n=8) und der normal KHCO₃-Gruppe ($0,84 \pm 0,16$ ml, n=8) wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied gefunden.

3.2. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Da Plasmavolumenveränderungen auch zu einer Änderung der GFR führen, wurde diese unter den kombinierten hoch Na⁺/K⁺-Diäten ebenfalls ermittelt. Hierfür wurde bei den PV-Tieren (2.2.3.2.) sowohl während der Basisdiät, als auch am 9. Tag der entsprechenden kombinierten Kalium/Natrium-Diät eine GFR-Messung durchgeführt.

GFR ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g b.w.}$)	Anion		
	Cl^-	Citrat	HCO_3^-
0,93% K^+; 0,24% Na^+	1398 \pm 159 (n=8)	1423 \pm 204 (n=6)	1496 \pm 179 (n=7)
0,93% K^+; 3% NaCl	1181 \pm 152 (n=8)	1388 \pm 201 (n=6)	1286 \pm 138 (n=7)

Tabelle 4: GFR während der Basisdiät und am 9. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei normal Kalium-Gruppen (0,93% K^+ ; 3% NaCl) war eine signifikante Änderung der GFR gegenüber den während der Basisdiät (0,93% K^+ ; 0,24% Na^+) gemessenen Werten nachweisbar. (Mittelwerte \pm SEM, n=6-8 pro Gruppe, paired Student's t-Test).

Die GFR war in den normal Kalium-Gruppen (0,93% K^+ ; 3% NaCl) nicht signifikant verändert gegenüber der GFR unter Basisdiät (0,93% K^+ ; 0,24% Na^+) (Tabelle 4). Unter Basisdiät betrug die mittlere GFR der normal KCl-Gruppe 1398 \pm 159 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=8) und unter Diätfutter (0,93% KCl; 3% NaCl) 1181 \pm 152 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=8). In der normal KCitrat-Gruppe betrug die mittlere GFR unter Basisdiät 1423 \pm 204 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=6) und unter Diätfutter (0,93% KCitrat; 3% NaCl) 1388 \pm 201 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=8). Für die Tiere der normal KHCO_3 -Gruppe ergab sich unter Basisdiät eine mittlere GFR von 1496 \pm 179 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=7), unter Diätfutter (0,93% KHCO_3 ; 3% NaCl) betrug diese 1286 \pm 138 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=7).

GFR ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$)	Anion		
	Cl^-	Citrat	HCO_3^-
0,93% K^+; 0,24% Na^+	1204 \pm 88 (n=9)	1495 \pm 164 (n=7)	1513 \pm 233 (n=8)
5% K^+; 3% NaCl	1316 \pm 176 (n=9)	1624 \pm 102 (n=7)	1472 \pm 177 (n=8)

Tabelle 5: GFR während der Basisdiät und am 9. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei hoch Kalium-Gruppen (5% K^+ ; 3% NaCl) war eine signifikante Änderung der GFR gegenüber den während der Basisdiät (0,93% K^+ ; 0,24% Na^+) ermittelten GFR-Werten nachweisbar. (Mittelwerte \pm SEM, n=7-9 pro Gruppe, paired Student's t-Test).

In keiner der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen war eine signifikante Änderung der GFR gegenüber den während der Basisdiät (0,93% K^+ ; 0,24% Na^+) bestimmten GFR-Werten nachweisbar (Tabelle 5). Unter Basisdiät betrug die mittlere GFR der hoch KCl-Gruppe 1204 \pm 88 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=9) und unter Diätfutter (5% KCl; 3% NaCl) 1316 \pm 176 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=9). In der hoch KCitrat-Gruppe betrug die mittlere GFR unter Basisdiät 1495 \pm 164 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=7) und unter Diätfutter (5% KCitrat; 3% NaCl) 1624 \pm 102 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=7). Für die Tiere der hoch KHCO_3 -Gruppe ergab sich während der Basisdiät eine mittlere GFR von 1513 \pm 233 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=8) und unter Diätfutter (5% KHCO_3 ; 3% NaCl) betrug diese 1472 \pm 177 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g b.w.}$ (n=8).

Die Abbildung 15 zeigt den GFR-Vergleich der normal (0,93%) und hoch (5%) Kalium-Gruppen. Wiederum lässt sich keine signifikante Veränderung der GFR in den hoch Kalium-Gruppen gegenüber der GFR in den normal Kalium-Gruppen nachweisen.

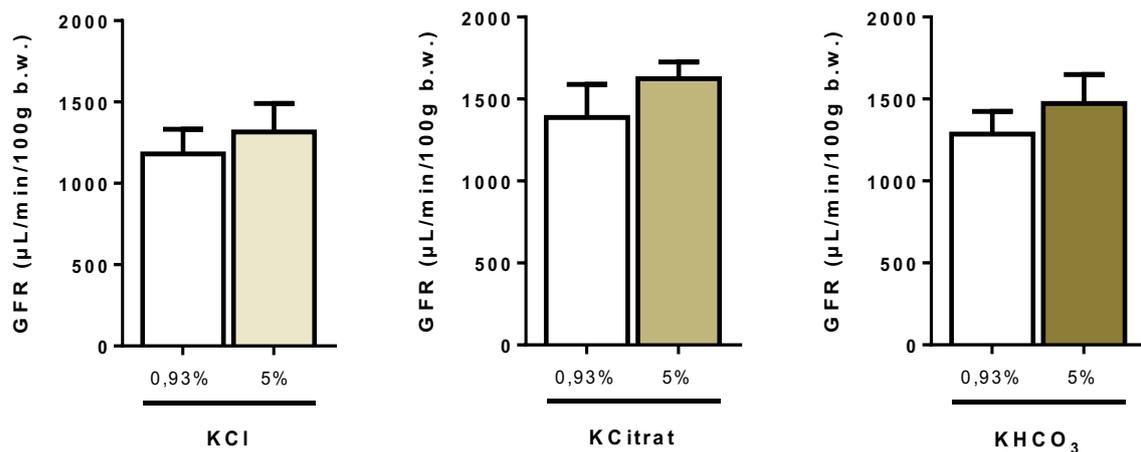


Abb. 15: GFR am 9. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei hoch Kalium-Gruppen (5% K⁺; 3% NaCl) war eine signifikante Änderung der GFR gegenüber den normal Kalium-Gruppen (0,93% K⁺; 3%NaCl) nachweisbar. (Mittelwerte ± SEM, n=6-9 pro Gruppe, Student's t-Test).

3.3. Urinelektrolyte

Da in allen drei hoch Kalium-Gruppen im Vergleich zu den normal Kalium-Gruppen eine signifikante Erhöhung der Aldosteronkonzentration im Plasma gefunden wurde (1.11.), sollten die Effekte auf die renale Elektrolyt-Ausscheidung untersucht werden. Da Aldosteron eine Kalium-Sekretion und Natrium-Retention in der Niere fördern kann, wurden die Konzentrationen von Natrium und Kalium im Urin bestimmt. Dafür wurden die ANP-Tiere (2.2.3.3.) zur Uringewinnung am 6. Tag der Diät für vier Stunden in einen metabolischen Käfig gesetzt. Am 10. Tag der Diät wurde der Urin durch Blasenpunktion entnommen. Die ermittelten Elektrolytkonzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatinin-Konzentration (Crea) in derselben Urinprobe ins Verhältnis gesetzt.

3.3.1. Kalium-Ausscheidung

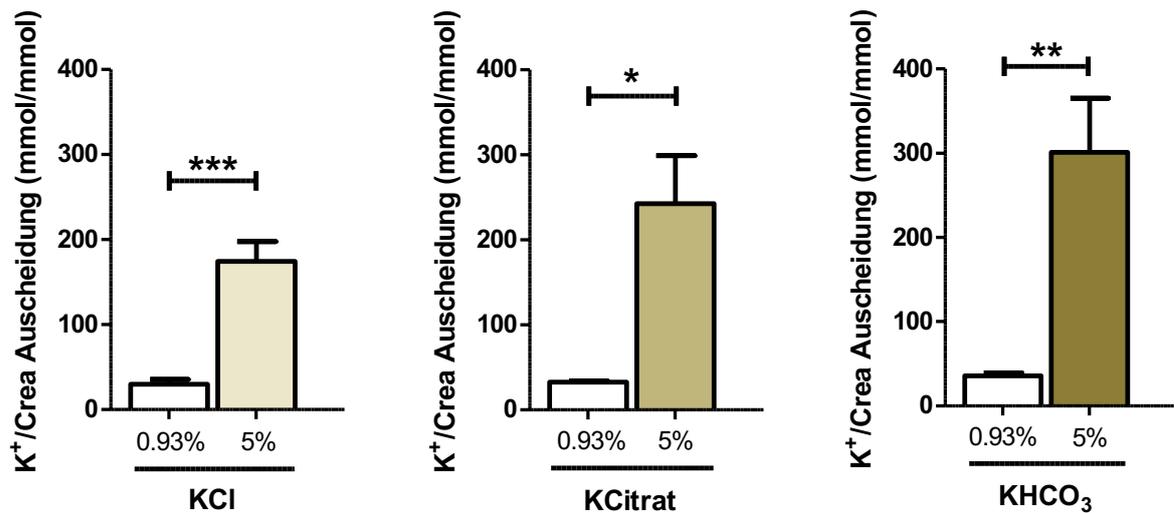


Abb. 16: Kalium-Ausscheidung am 6. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Beim Vergleich der Kalium-Ausscheidung der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe ließ sich in allen drei Kaliumsalz-Gruppen (KCl, KCitrat und KHCO₃) eine signifikant erhöhte Kalium-Ausscheidung nachweisen. Die Kaliumkonzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatinin-Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwert ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5-8 pro Gruppe, Student's t-Test).

Im Vergleich zwischen der normal KCl- und der hoch KCl-Gruppe zeigt sich eine signifikante Erhöhung (p<0,0001) der Kalium-Ausscheidung am 6. Tag der Diät (Abb. 16 und Tabelle 6). Ebenfalls ließ sich eine signifikante Erhöhung sowohl zwischen der normal KCitrat- und der hoch KCitrat-Gruppe (p<0,05) als auch zwischen der normal KHCO₃- und der hoch KHCO₃-Gruppe (p<0,01) nachweisen.

	KCl		KCitrat		KHCO ₃	
	0,93%	5%	0,93%	5%	0,93%	5%
6. Tag	29,8 ± 5,9 (n=8)	174,6 ± 23,4 *** (n=7)	32,4 ± 1,3 (n=5)	242,5 ± 56,6 * (n=8)	35,7 ± 3,7 (n=7)	301,1 ± 63,9 ** (n=8)
10. Tag	79 ± 10,9 (n=6)	499,3 ± 134,1 * (n=7)	133,8 ± 33,1 (n=4)	276,3 ± 57,4 (n=7)	75,4 ± 25,2 (n=8)	501,4 ± 128,4 ** (n=8)

Tabelle 6: Kalium-Ausscheidung (mmol/mmol) am 6. und 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Beim Vergleich der Kalium-Ausscheidung der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe ließ sich am 6. Tag in allen drei verschiedenen Kaliumsalz-Gruppen eine signifikant erhöhte Kalium-Ausscheidung nachweisen. Am 10. Tag der Diät zeigte sich eine signifikante Veränderung der Kalium-Ausscheidung in der KCl- und KHCO₃-Gruppe. Zwischen der normal und hoch KCitrat-Gruppe fand sich keine signifikante Veränderung. Die Kaliumkonzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatinin-Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwert ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, Student's t-Test).

Am 10. Tag (Tabelle 6) ließ sich eine signifikant erhöhte Kalium-Ausscheidung (p<0,05) zwischen der normal KCl- und der hoch KCl-Gruppe nachweisen. Dies war zwischen der normal KHCO₃ und der hoch KHCO₃ –Gruppe ebenfalls der Fall (p<0,001). Die am 6. Tag der Diät festgestellte signifikante Erhöhung zwischen normal KCitrat- und hoch KCitrat-Gruppe zeigte sich am 10. Tag nicht mehr (p=0,114). Jedoch kann dies durch die geringe Anzahl der Tiere (n=4) in der normal KCitrat-Gruppe bedingt sein.

3.3.2. Natrium-Ausscheidung

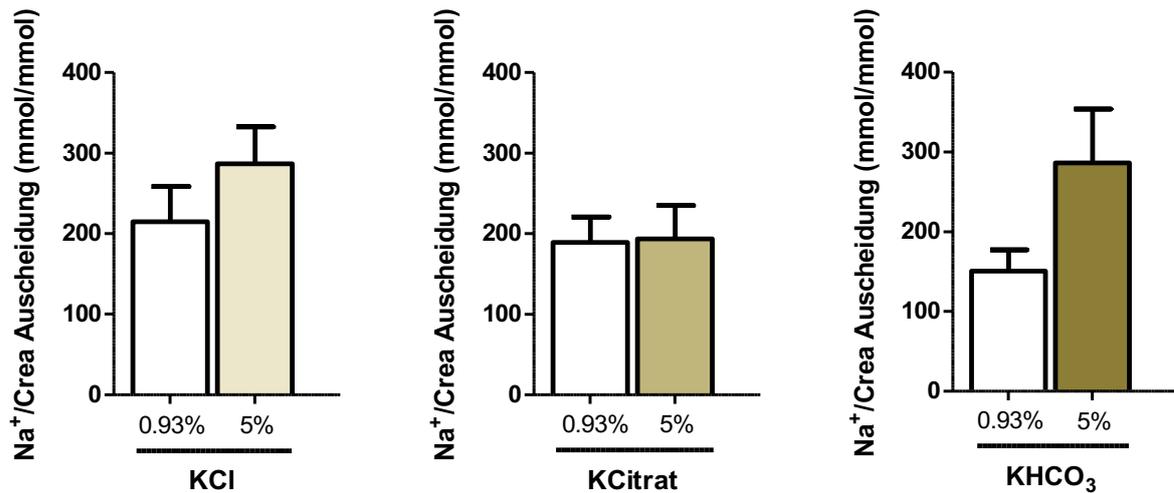


Abb. 17: Natrium-Ausscheidung am 6. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen war eine signifikante Zu- oder Abnahme der Natrium-Ausscheidung gegenüber den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe nachweisbar. Die Natriumkonzentrationen wurden zur jeweiligen Kreatinin-Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwerte \pm SEM, n=5-8 pro Gruppe, Student's t-Test).

Es ließen sich am 6. Tag der Diät (Abb. 17 und Tabelle 7) keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Natrium-Ausscheidung zwischen den hoch und normal Kalium-Gruppen der drei verschiedenen Kaliumsalze nachweisen. Jedoch zeigte sich am 10. Tag der Diät (Tabelle 7) eine signifikante Erniedrigung ($p < 0,05$) der Natrium-Ausscheidung in der hoch KCitrat- verglichen mit der normal KCitrat-Gruppe. Allerdings könnte dies auf die geringe Anzahl der Tiere in der normal KCitrat-Gruppe (n=4) zurückzuführen sein. Eine signifikante Erniedrigung der Natrium-Ausscheidung zeigte sich weder zwischen der normal KCl- und hoch KCl-Gruppe, noch zwischen der normal KHCO₃- und hoch KHCO₃-Gruppe.

	KCl		KCitrat		KHCO ₃	
	0,93%	5%	0,93%	5%	0,93%	5%
6. Tag	214,8 ± 43,7 (n=8)	286,9 ± 46,1 (n=7)	189,2 ± 31,6 (n=5)	193,4 ± 41,6 (n=8)	150,9 ± 26,6 (n=7)	286,6 ± 67,3 (n=8)
10. Tag	386,3 ± 93,3 (n=6)	474,0 ± 97,6 (n=7)	441,5 ± 86,9 (n=4)	224,1 ± 52,6 * (n=7)	341,0 ± 114,3 (n=8)	486,4 ± 117,8 (n=8)

Tabelle 7: Natrium-Ausscheidung (mmol/mmol) am 6. und 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Beim Vergleich der Natrium-Ausscheidung der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe ließ sich am 6. Tag in keiner der drei verschiedenen Kaliumsalz-Gruppen eine signifikante Veränderung der Natrium-Ausscheidung nachweisen. Am 10. Tag der Diät zeigte sich nur zwischen der normal und der hoch KCitrat-Gruppe eine signifikante Abnahme der Natrium-Ausscheidung (Mittelwert ± SEM, *p<0,05, Student's t-Test).

Eine erhöhte Natrium-Retention, wie sie unter erhöhtem Aldosteron-Plasmaspiegel vermutet werden würde, konnte somit am 6. Tag der Diät in keiner Kalium-Gruppe und am 10. Tag der Diät nicht für alle Kaliumsalze nachgewiesen werden.

3.4. Plasmaelektrolyte und Säure-Base-Status

Hinsichtlich der Frage, ob eine hohe Zufuhr von Kalium in Verbindung mit einer hohen Zufuhr von Kochsalz (NaCl) Einfluss auf die Konzentration der Plasmaelektrolyte hat, wurde den ANP-Tieren (2.2.3.3.) am 10. Tag der Diät unter Isofluran-Narkose Blut entnommen und eine BGA-Analyse durchgeführt. Im Rahmen der Analyse wurde gleichzeitig der Säure-Base-Status erhoben, da eine mögliche Störung im Säure-Base-Haushalt durch die unterschiedlichen Anionen im Diät-Futter untersucht werden sollte.

3.4.1. Plasmaelektrolyte

3.4.1.1. Natriumkonzentration im Plasma

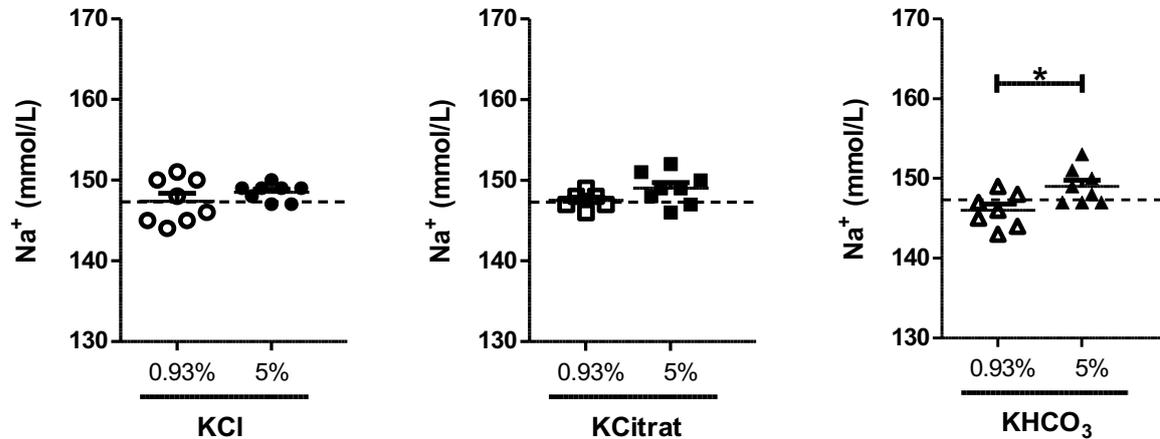


Abb. 18: Natriumkonzentrationen im Plasma am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Beim Vergleich der Natriumkonzentration im Plasma der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe ließ sich nur in der KHCO₃-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Natriumkonzentration nachweisen. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwerte ± SEM, *p<0,05, n=6-8 pro Gruppe, Student's t-Test). Die gestrichelte Linie stellt die mittlere Plasmanatrium-Konzentration von drei Tieren während der Basisdiät (0,93% K⁺; 0,24% Na⁺) dar.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der Plasmanatrium-Konzentration in der hoch KHCO₃ - ($149,0 \pm 1,1$ mmol/l, n=8) verglichen mit der normal KHCO₃-Gruppe ($146,0 \pm 0,8$ mmol/l, n=7). Zwischen der hoch KCl- ($148,5 \pm 0,4$ mmol/l, n=8) und der normal KCl- Gruppe ($147,4 \pm 1,0$ mmol/l, n=8) und auch zwischen der hoch KCitrat- ($149,0 \pm 0,7$ mmol/l, n=8) und der normal KCitrat-Gruppe ($147,5 \pm 0,4$ mmol/l, n=6) fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18)

3.4.1.2. Kaliumkonzentration im Plasma

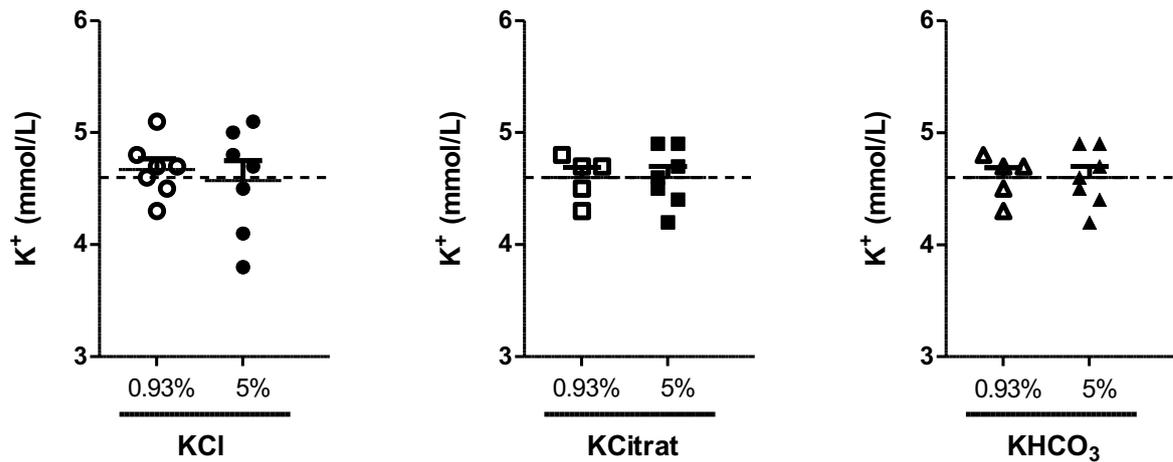


Abb. 19: Kaliumkonzentrationen im Plasma am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. In keiner der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen war eine signifikante Veränderung der Plasmakalium-Konzentration gegenüber den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe nachweisbar. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwerte \pm SEM, $n=5-8$ pro Gruppe, Student's t-Test). Die gestrichelte Linie stellt die mittlere Plasmakalium-Konzentration von drei Tieren unter Basisdiät (0,93% K^+ ; 0,24% Na^+) dar.

Am 10. Tag der Diät (Abb. 19) ließen sich keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Kaliumkonzentration im Plasma der drei hoch Kalium-Gruppen und der jeweils entsprechenden normal Kalium-Gruppe nachweisen. Für die Tiere der normal KCl-Gruppe ergab sich eine Plasmakalium-Konzentration von $4,67 \pm 0,1$ mmol/l ($n=7$). In der hoch KCl-Gruppe konnte eine mittlere Plasmakalium-Konzentration von $4,57 \pm 0,2$ mmol/l ($n=7$) gemessen werden. Die mittlere Plasmakalium-Konzentration betrug sowohl in der hoch KCitrat- ($n=5$) als auch in der normal KCitrat-Gruppe ($n=7$) $4,6 \pm 0,1$ mmol/l. Zwischen der hoch KHCO₃- ($4,7 \pm 0,2$ mmol/l, $n=8$) und der normal KHCO₃-Gruppe ($4,9 \pm 0,1$ mmol/l, $n=6$) konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

3.4.1.3. Chloridkonzentration im Plasma

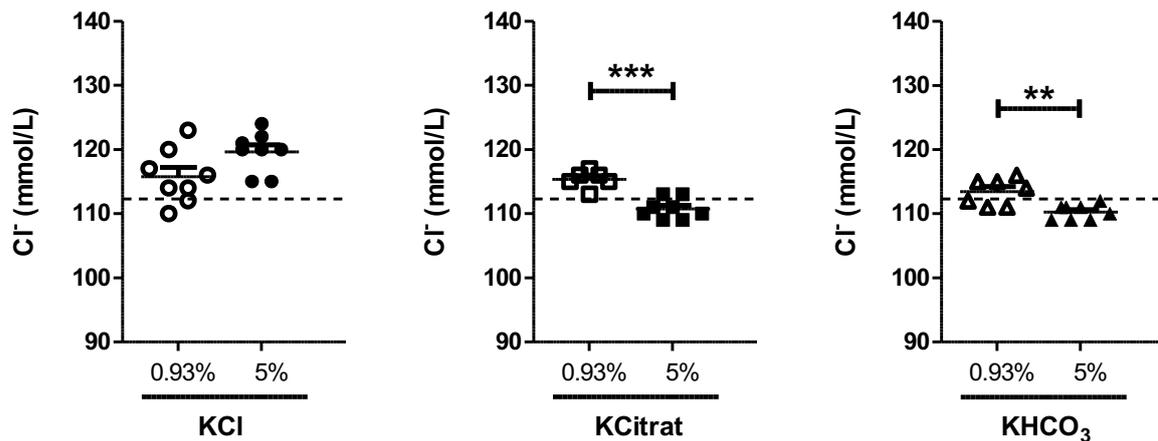


Abb. 20: Chloridkonzentrationen im Plasma am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Beim Vergleich der Chloridkonzentration im Plasma zwischen den drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit den Tieren der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe ließen sich signifikante Veränderungen nachweisen. Es fanden sich sowohl zwischen der normal KCitrat- und der hoch KCitrat-Gruppe, als auch zwischen der normal und hoch KHCO₃-Gruppe signifikante Erniedrigungen der Plasmachlorid-Konzentration im Plasma. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwerte ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p=0,001, n=6-8 pro Gruppe, Student's t-Test). Die gestrichelte Linie stellt die mittlere Plasmachlorid-Konzentration von drei Tieren unter Basisdiät (0,93% K⁺; 0,24% Na⁺) dar.

Im Vergleich der normal KCitrat-Gruppe (115,3 ± 0,6 mmol/l, n=6) und der hoch KCitrat-Gruppe (110,8 ± 0,6 mmol/l, n=8) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Chloridkonzentration im Plasma (p=0,0001). Eine signifikante Abnahme (p=0,003) zeigte sich ebenfalls im Vergleich zwischen der normal KHCO₃- (113,4 ± 0,8 mmol/l, n=7) und der hoch KHCO₃-Gruppe (110,3 ± 0,4 mmol/l, n=8). Zwischen der normal KCl- (115,8 ± 1,5 mmol/l, n=8) und der hoch KCl-Gruppe (119,6 ± 1,1 mmol/l, n=8) zeigte sich eine Erhöhung der Plasmachlorid-Konzentration, welche jedoch statistisch nicht signifikant (p=0,057) war (Abb. 20).

Trotz der hohen Kalium-Zufuhr war in keiner der drei hoch Kalium-Gruppen eine Hyperkaliämie zu beobachten. Die Plasmanatrium-Konzentration war trotz hoch NaCl-Zufuhr nicht generell erhöht. Die Plasmachlorid-Konzentration war in zwei hoch K⁺-Gruppen erniedrigt.

3.4.2. Säure-Base-Status

	KCl		KCitrat		KHCO ₃	
	0,93%	5%	0,93%	5%	0,93%	5%
pH (Blut)	7,38 ± 0,01 (n=8)	7,35 ± 0,02 (n=8)	7,39 ± 0,01 (n=6)	7,47 ± 0,01 *** (n=8)	7,41 ± 0,01 (n=7)	7,45 ± 0,01 (n=8)
pCO₂ [mmHg]	35,5 ± 1,4 (n=8)	33,9 ± 1,3 (n=8)	35,0 ± 0,6 (n=6)	34,9 ± 1,1 (n=8)	33,8 ± 0,6 (n=7)	37,5 ± 0,9 ** (n=8)
SBC/(HCO₃)_{st} [mmol/l]	21,0 ± 0,6 (n=8)	19,1 ± 0,8 (n=8)	21,1 ± 0,5 (n=6)	25,5 ± 0,9 ** (n=8)	22,0 ± 0,2 (n=7)	25,7 ± 0,6 *** (n=8)
Anionenlücke [mmol/l]	10,6 ± 0,4 (n=8)	10,2 ± 1,0 (n=8)	11,1 ± 0,7 (n=6)	12,7 ± 0,4 * (n=8)	11,0 ± 0,3 (n=7)	12,9 ± 0,6 * (n=8)

Tabelle 8: BGA-Analyse am 10. Tag der kombinierten Kalium/Natrium-Diäten. Zwischen der normal (0,93%) und hoch (5%) KCl-Gruppe fanden sich keine signifikanten Änderungen. Beim Vergleich der normal (0,93%) und hoch (5%) KCitrat-Gruppe ließen sich hinsichtlich des pH-Wertes, des SBC/HCO₃⁻_{st} und der Anionenlücke jeweils signifikante Erhöhungen nachweisen. Zwischen der normal (0,93%) und hoch (5%) KHCO₃-Gruppe fanden sich signifikante Erhöhungen hinsichtlich des pCO₂, des SBC/HCO₃⁻_{st} und der Anionenlücke. Alle Tiere erhielten zusätzlich zu den Kaliumdiäten eine hoch (3%) NaCl-Diät (Mittelwert ± SEM, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, Student's t-Test). pCO₂: Kohlenstoffdioxidpartialdruck, SBC/HCO₃⁻_{st}: Standardbikarbonat.

Mithilfe der am 10. Tag der Diät erfolgten Blut-Gas-Analysen (BGA) wurde der Säure-Base-Status der drei hoch (5%) Kalium-Gruppen mit dem der entsprechenden normal (0,93%) Kalium-Gruppe verglichen. Dabei fanden sich zwischen der normal und hoch KCl-Gruppe keine signifikanten Änderungen hinsichtlich des pH-Wertes, des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes (pCO₂), des Standardbikarbonats (SBC/HCO₃⁻_{st}) oder der Anionenlücke (Tabelle 8). Der pH-Wert, der Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO₂) und das Standardbikarbonat (SBC/HCO₃⁻_{st}) sind in der hoch KCl-Gruppe leicht, jedoch

nicht signifikant erniedrigt. Anhand dieser Werte ist in der hoch (5%) KCl-Gruppe eine metabolische Azidose nicht nachweisbar. Somit kann von einer Störung im Säure-Base-Haushalt nicht ausgegangen werden.

Beim Vergleich der normal (0,93%) und der hoch (5%) KCitrat-Gruppe fand sich eine signifikante Erhöhung ($p=0,0002$) des pH-Werts (Tabelle 8). Ebenso ließ sich zwischen diesen beiden Gruppen eine signifikante Erhöhung des Standardbikarbonats ($\text{SBC}/\text{HCO}_3^-_{\text{st}}$) ($p=0,003$) und der Anionenlücke ($p=0,04$) nachweisen. Somit zeigt sich in der hoch (5%) KCitrat-Gruppe das typische Bild einer metabolischen Alkalose.

Zwischen der normal und der hoch KHCO_3 -Gruppe, zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes ($p\text{CO}_2$) ($p=0,006$), des Standardbikarbonats ($\text{SBC}/\text{HCO}_3^-_{\text{st}}$) ($p=0,0001$) und der Anionenlücke ($p=0,015$) (Tabelle 8). Somit zeigt sich auch in der hoch KHCO_3 -Gruppe – wie bereits in der hoch KCitrat-Gruppe – das typische Bild einer metabolischen Alkalose. In der hoch KHCO_3 -Gruppe scheint diese metabolische Alkalose respiratorisch teilkompensiert zu sein.

3.5. Herzfrequenz (HF)

Da die durchgeführten Experimente keinen Hinweis auf eine Erhöhung des EZVs ergaben, sollte untersucht werden, ob die Herzfrequenz als Ursache des beobachteten Blutdruckanstiegs unter kombinierter hoch Kalium/Natrium-Diät in Frage kommt.

Hierfür wurden die Herzfrequenzen der nächtlichen Stundenwerte der Telemetrie-Tiere (2.2.3.4.) gemittelt (HF_{night}) und zwischen der Basisgruppe und der hoch KCl-Gruppe verglichen. Dabei konnte zwischen der Basisgruppe ($517,3 \pm 15,2$ beats/min, $n=7$) und der hoch KCl-Gruppe ($538,3 \pm 26,8$ beats/min, $n=7$) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 21).

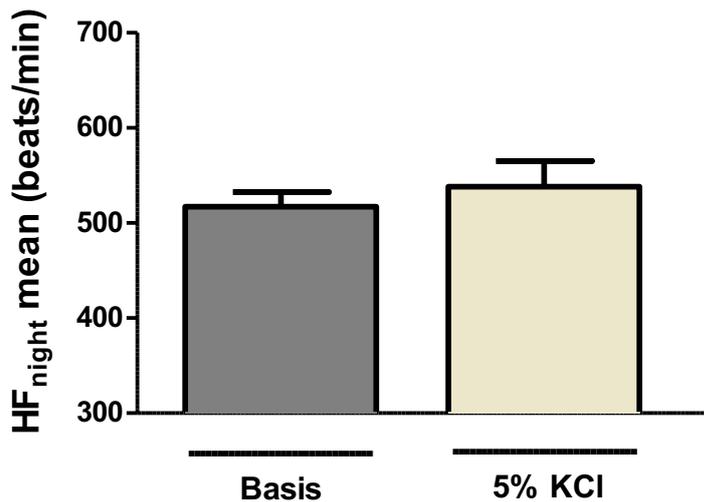


Abb. 21: HF_{night} unter Basisdiät und kombinierter hoch Kaliumchlorid/Natriumchlorid-Diät. Es konnte kein signifikanter Unterschied der HF_{night} zwischen der hoch KCl-Gruppe und der Basismessung festgestellt werden. Dargestellt ist jeweils die HF_{night} vor Beginn (Basis) und am Ende der 10-tägigen Diät (Mittelwert \pm SEM, n=7 pro Gruppe, paired Student's t-Test).

Um die Abhängigkeit des Blutdruckes von der Herzfrequenz zu untersuchen, wurde der für jedes HF-Intervall ermittelte MAP_{night}-Wert gegenüber der HF aufgetragen (2.2.13.). Dies geschah sowohl für die Basismessung als auch für die Messung unter kombinierter hoch Kaliumchlorid/Natriumchlorid-Diät. Dabei konnte in fast allen Herzfrequenzbereichen eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) des MAP_{night} in der hoch KCl-Gruppe gegenüber der Basismessung festgestellt werden (Abb. 22). Somit konnte gezeigt werden, dass bei gleichen Herzfrequenzen der MAP_{night} in der hoch KCl-Gruppe im Vergleich zur Basismessung signifikant erhöht war.

Aufgrund der in Abb. 21 (HF_{night}) und Abb. 22 (MAP_{night} vs. HF) dargestellten Ergebnisse wurde ein Anstieg der Herzfrequenz als Ursache des Blutdruckanstiegs in der hoch KCl-Gruppe nicht angenommen.

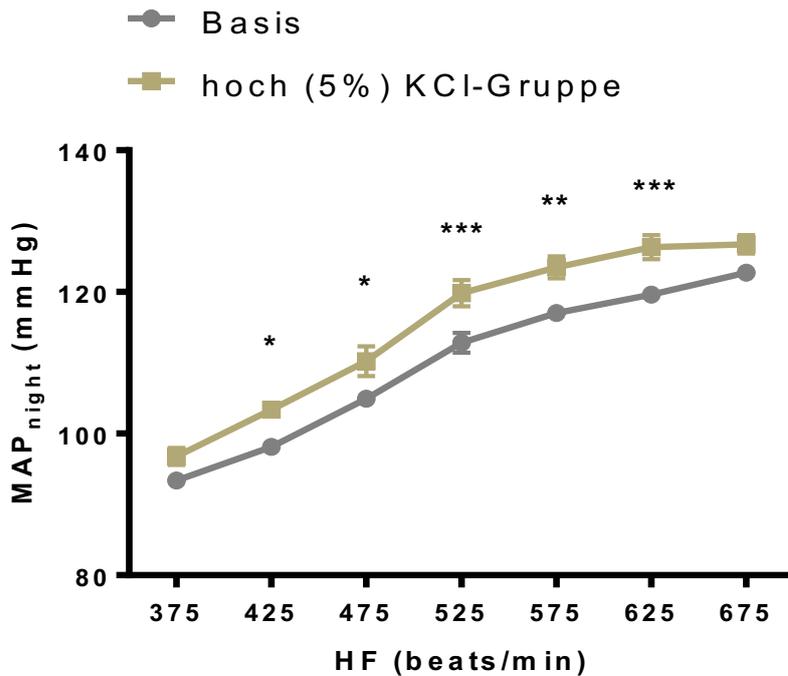


Abb. 22: MAP_{night} in Abhängigkeit der gemessenen HF unter Basisdiät und kombinierter hoch Kaliumchlorid/Natriumchlorid-Diät (MAP_{night} vs. HF). Beim Vergleich der hoch KCl-Gruppe mit der Basismessung fanden sich bei gleichen Herzfrequenzen zahlreiche signifikante Erhöhungen des MAP_{night} (Mittelwert ± SEM, n=7 pro Gruppe, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, paired two-way ANOVA mit Bonferroni Post Hoc Test).

3.6. Blutdruck unter Spironolactonbehandlung

Der beobachtete Blutdruckanstieg (1.11.) sollte auch in der hoch KCl-Gruppe näher untersucht werden. Da der Blutdruckanstieg als Folge einer erhöhten Aldosteron-Wirkung vermutet wurde, wurde eine medikamentöse Blockade des Aldosteronrezeptors mithilfe von Spironolacton-Pellets durchgeführt.

Die telemetrische Messung (2.2.3.) erfolgte dabei sowohl ohne und mit MR-Blockade im gleichen Tier. Aus diesem Grund wurde nach der Basismessung (0,93% K⁺; 0,24% Na⁺) bei drei Tieren der hoch (5%) KCl-Gruppe vor Diätbeginn ein Spironolacton-Pellet implantiert (2.2.14.). In den letzten drei Tagen der Diät wurde der Blutdruck erneut telemetrisch gemessen. Nach dieser Diät wurde das Pellet entfernt.

Nach einer Pause von mindestens 28 Tagen erhielten die Tiere nochmals 5% KCl in Kombination mit 3% NaCl, jedoch ohne Spironolacton-Pellet. Am Ende der Diät wurde der Blutdruck erneut gemessen (Abb. 23).

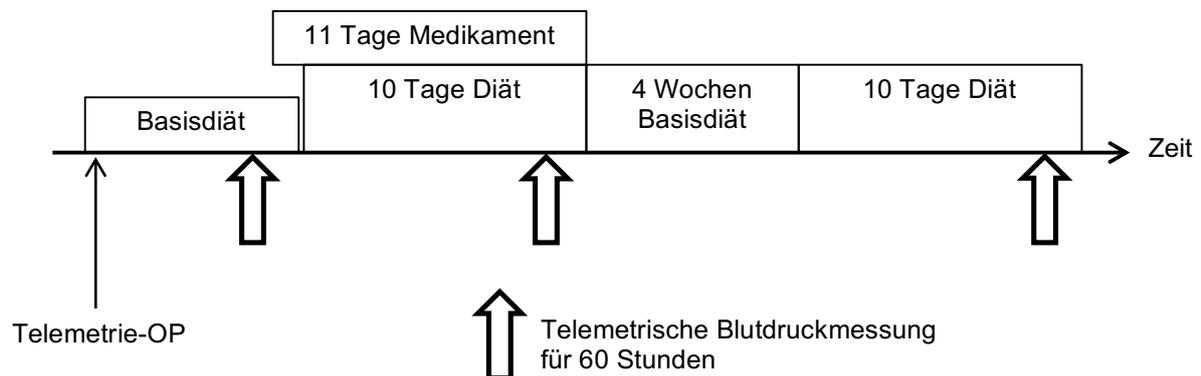


Abb. 23: Zeitlicher Ablauf der Versuche.

Bei drei weiteren Tieren wurde zunächst die 5% KCl- in Kombination mit 3% NaCl-Diät ohne Spironolactonbehandlung und nach einer Pause von mindestens 28 Tagen dieselbe Diät jedoch unter Spironolactonbehandlung durchgeführt (Abb. 24). Auch hier fanden jeweils am Ende der Diäten die Blutdruckmessungen statt.

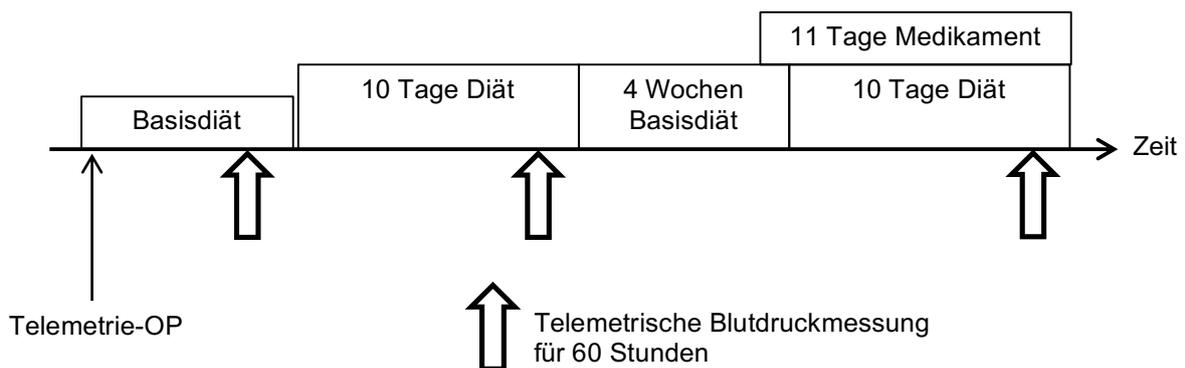


Abb. 24: Zeitlicher Ablauf der Versuche.

Die Tiere zeigten unter allen Bedingungen einen circadianen Tag- und Nachtrhythmus, der sich sowohl in der Aktivität der Tiere als auch beim mittleren arteriellen Druck (MAP) und der HF zeigte. Der MAP war während der nächtlichen Aktivitätsphase (MAP_{night}) sowohl in der hoch KCl-Gruppe mit Spironolacton-Pellet, als auch in derselben Gruppe ohne Pellet gegenüber der Basismessung signifikant erhöht (Abb. 25).

Eine medikamentöse Blockade des Aldosteronrezeptors mithilfe von Spironolacton-Pellets konnte den Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe nicht verhindern. Zwischen der hoch (5%) KCl-Gruppe mit Spironolacton-Pellet und der hoch (5%) KCl-Gruppe ohne Pellet fand sich kein signifikanter Unterschied.

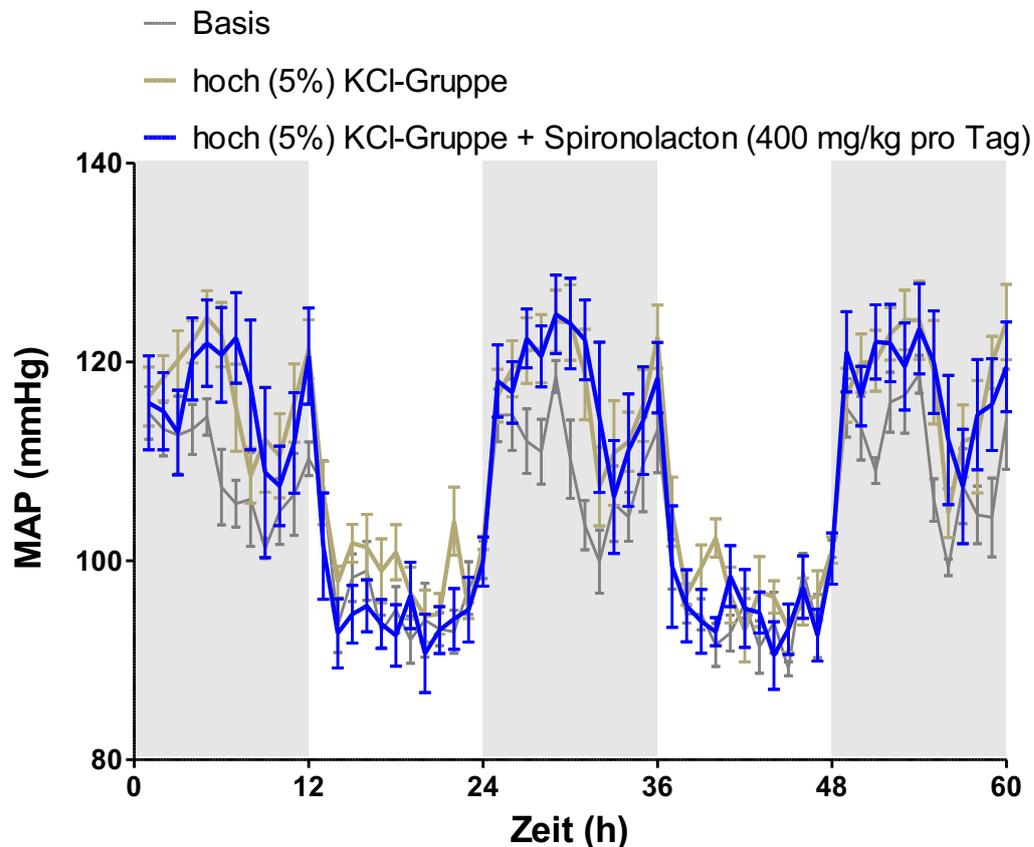


Abb. 25: Einfluss von Spironolacton auf den MAP unter kombinierter hoch Kaliumchlorid/Natriumchlorid-Diät. Der MAP stieg während der nächtlichen Aktivitätsphase sowohl mit (400 mg/kg pro Tag) als auch ohne Spironolactonbehandlung im Vergleich zur Basis signifikant an. Zwischen der hoch (5%) KCl-Gruppe mit Spironolacton und der hoch (5%) KCl-Gruppe ohne Spironolacton fand sich kein signifikanter Unterschied. Dargestellt sind die Verläufe des MAP am Ende der 10-tägigen Diäten. Die Tiere der hoch KCl-Gruppe erhielten 5% KCl; 3% NaCl-Diäten in Kombination mit Spironolacton-Pellet (blau) oder ohne Spironolacton-Pellet (beige). Der MAP-Verlauf unter Basisdiät (0,93% K⁺; 0,24% Na⁺) ist grau dargestellt. Die grau hinterlegten Bereiche stellen die Nacht- bzw. Aktivitätsphasen der Tiere dar (Mittelwert \pm SEM, n=6 pro Gruppe, paired two-way ANOVA mit Bonferroni Post Hoc Test).

Während der täglichen Ruhephase fand sich hinsichtlich des MAP (MAP_{day}) zwischen den verschiedenen Gruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 26). Für die Basismessung ergab sich für den MAP_{day} im Mittel ein Wert von $93,5 \pm 3,4$ mmHg.

In der hoch KCl-Gruppe ohne Spironolactonbehandlung betrug der MAP_{day} im Mittel $96,7 \pm 3,6$ mmHg. In der hoch KCl-Gruppe mit Spironolactonbehandlung ergaben die Messungen im Mittel für den MAP_{day} $94,0 \pm 4,6$ mmHg.

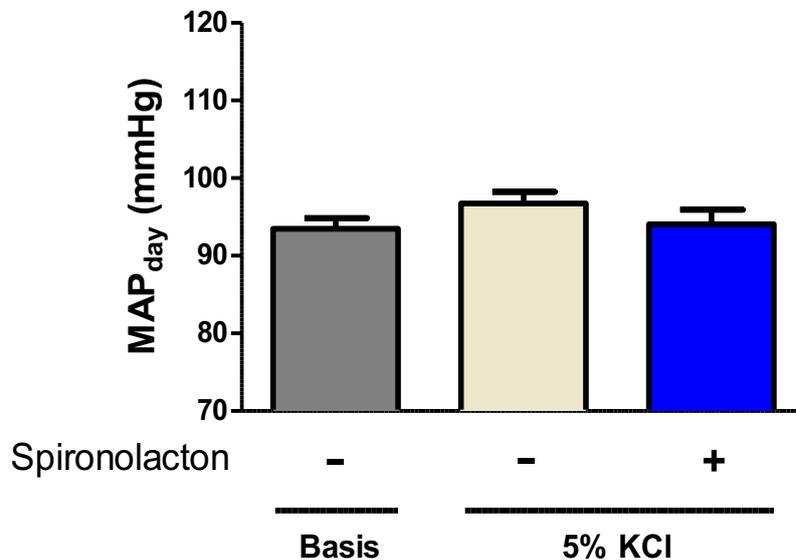


Abb. 26: Einfluss von Spironolacton auf den MAP_{day} unter kombinierter hoch Kaliumchlorid/Natriumchlorid-Diät. Es fand sich kein signifikanter Unterschied des MAP_{day} zwischen den drei untersuchten Gruppen. Dargestellt ist jeweils der MAP_{day} vor Beginn (Basis) und am Ende der 10-tägigen Diät mit (blau) bzw. ohne (beige) Spironolacton-Pellet (Mittelwert \pm SEM, n=6 pro Gruppe, paired one-way ANOVA mit Newman-Keuls Post Hoc Test).

Eine Normalisierung des in der hoch (5%) KCl-Gruppe beobachteten Blutdruckanstiegs konnte mithilfe von Spironolacton nicht erzielt werden (Abb. 27). Der MAP_{night} war beim Vergleich der hoch (5%) KCl-Gruppe mit Spironolactonbehandlung ($120,1 \pm 4,6$ mmHg) mit der Basismessung ($109,1 \pm 1,5$ mmHg) signifikant erhöht ($p < 0,05$). Zwischen der hoch (5%) KCl-Gruppe ohne Spironolactonbehandlung ($118,3 \pm 2,6$ mmHg) und der Basismessung ($109,1 \pm 1,5$ mmHg) fand sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung des MAP_{night} ($p < 0,05$). Beim Vergleich der hoch (5%) KCl-Gruppe ohne Spironolacton-Pellet mit derselben Diät mit Spironolacton-Pellet fand sich hinsichtlich des MAP_{night} kein signifikanter Unterschied.

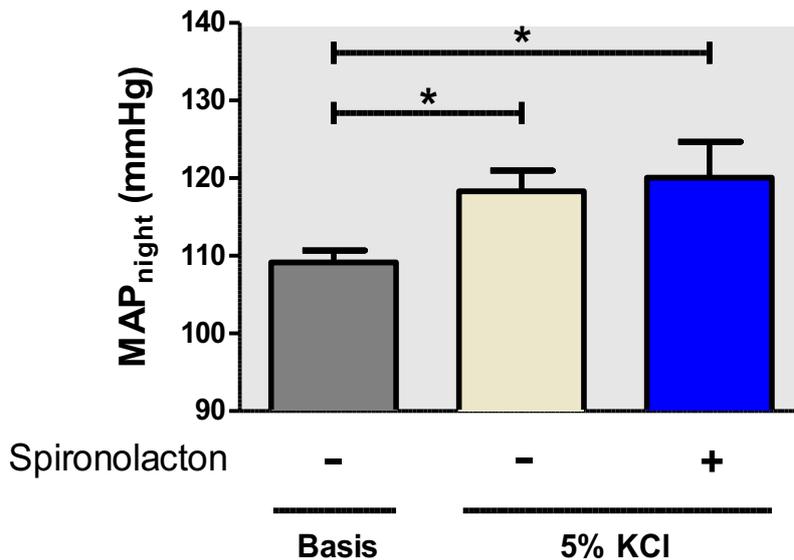


Abb. 27: Einfluss von Spironolacton auf den MAP_{night} unter kombinierter hoch Kaliumchlorid/Natriumchlorid-Diät. Der MAP_{night} stieg während der nächtlichen Aktivitätsphase sowohl mit (400 mg/kg pro Tag) als auch ohne Spironolactonbehandlung im Vergleich zur Basisdiät signifikant an. Beim Vergleich der hoch (5%) KCl-Gruppe ohne Spironolacton-Pellet (beige) mit derselben Diät mit Spironolacton-Pellet (blau) fand sich kein signifikanter Unterschied. Dargestellt ist jeweils der MAP_{night} während der Aktivitätsphase der Tiere vor Beginn (Basis) und am Ende der 10-tägigen Diät mit bzw. ohne Spironolactonbehandlung (Mittelwert \pm SEM, n=6 pro Gruppe, *p<0,05, paired one-way ANOVA mit Newman-Keuls Post Hoc Test).

Zusammenfassend ließ sich wie schon in der hoch KCitrat-Gruppe (Vitzthum et al., 2014) der beobachtete Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe mittels einer MR-Blockade nicht normalisieren.

4. Diskussion

Mit über 1 Milliarde an Bluthochdruck (Hypertonie) erkrankten Menschen weltweit ist er einer der bedeutendsten Risikofaktoren für eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems, die aktuell häufigste Todesursache (WHO, 2014). Damit steht die Hypertonie im Mittelpunkt aktueller Forschungsinteressen. Inzwischen ist eine Vielzahl an Ursachen bekannt, welche eine Hypertonie induzieren können. Prinzipiell wird die Hypertonie in eine primäre, multifaktoriell bedingte und in eine sekundäre, durch eine organische Erkrankung ausgelöste Hypertonie unterteilt.

Ein typisches Beispiel einer sekundären Hypertonie ist der primäre Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom, PA). Dieser beschreibt eine Erkrankung, welche durch eine autonom erhöhte Aldosteronproduktion gekennzeichnet ist. Die im Rahmen des Conn-Syndroms nahezu immer vorkommende Hypertonie beruht hauptsächlich auf der Wirkung des Aldosterons in der Niere (Rossier et al., 2013). Dort sorgt Aldosteron durch eine vermehrte ENaC-vermittelte Na^+ -Retention für eine Volumenexpansion. Dies führt schließlich zur Entwicklung einer Hypertonie (Stewart, 1999).

Bei der primären Hypertonie liegt im Gegensatz zur sekundären Hypertonie keine organische Grunderkrankung als Ursache vor. Man spricht von einer multifaktoriell bedingten primären Hypertonie, da sowohl genetische Dispositionen als auch Umweltfaktoren wie z.B. eine niedrige K^+ -Zufuhr oder eine erhöhte NaCl -Zufuhr für die Entwicklung dieser verantwortlich gemacht werden (Calhoun et al., 2008). Dem gegenüber kann sich somit auch eine Änderung der Umweltfaktoren wie eine gesteigerte K^+ -Zufuhr positiv auf den Blutdruck auswirken (Appel et al., 2010). Verschiedene Studien konnten sowohl an Mäusen als auch an Ratten einen ähnlichen Einfluss einer unterschiedlichen K^+ -Zufuhr auf den Blutdruck zeigen. (Vitzthum et al., 2014, Terker et al., 2015). Jedoch scheint der blutdrucksenkende Effekt mit weiter steigendem K^+ -Gehalt der Nahrung zu verschwinden. So zeigten sowohl Mäuse (Vitzthum et al., 2014) als auch Ratten (Manger et al., 2003) unter hoch K^+ - und hoch NaCl -Diät erneut einen Blutdruckanstieg. Der Anstieg des Blutdrucks ging in beiden Fällen mit einer Erhöhung der Aldosteronkonzentration im Plasma einher. Da die Renin-Freisetzung durch die hohe Salzzufuhr vermindert und die Aldosteron-Freisetzung durch die erhöhte Kaliumzufuhr jedoch induziert wurde, lag bei den Tieren,

ähnlich wie beim Conn-Syndrom, ein erhöhtes Aldosteron-Renin-Verhältnis vor (Manger et al., 2003, Vitzthum et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher geklärt werden, ob z.B. eine renale Na^+ -Retention mit resultierender Plasmavolumenexpansion oder eine Steigerung der Herzfrequenz ursächlich für den beobachteten Blutdruckanstieg ist, wenn mit viel NaCl versorgte Mäuse unterschiedliche hoch K^+ -Diäten (KCl, KCitrat und KHCO_3) erhalten.

Anhand der verschiedenen hoch K^+ -Diäten wurden unterschiedliche hoch Kalium-Gruppen definiert (Tabelle 1).

4.1. Hinweise auf eine renale Na^+ -Retention und

Plasmavolumenexpansion

Ursächlich für den Blutdruckanstieg könnte wie z.B. beim Conn-Syndrom eine vermehrte Aldosteron-induzierte renale Na^+ -Retention sein, bei dem sich aufgrund der Volumenexpansion eine Hypertonie entwickelt (Stewart, 1999). Um eine mögliche renale Na^+ -Retention direkt nachzuweisen, wurde die Na^+ -Ausscheidung der Tiere der hoch Kalium-Gruppen am 6. und 10. Tag der Diät untersucht. Eine erhöhte Na^+ -Retention bzw. eine verminderte Na^+ -Ausscheidung konnte trotz erhöhtem Aldosteronspiegel am 6. Tag der Diät in keiner der drei hoch Kaliumdiät-Gruppen nachgewiesen werden. Am 10. Tag der Diät ergaben sich unterschiedliche Befunde in den drei hoch Kaliumdiät-Gruppen. Während in der hoch KCl- und in der hoch KHCO_3 -Gruppe auch am 10.Tag der Diät keine Na^+ -Retention beobachtet wurde, zeigte sich in der hoch KCitrat-Gruppe eine verminderte renale Na^+ -Ausscheidung (Tabelle 7). Dies deckt sich mit Ergebnissen von Vitzthum et al., welche ebenfalls eine signifikant erniedrigte renale Na^+ -Ausscheidung in der hoch KCitrat-Gruppe am 10.Tag der Diät beobachten konnte (Vitzthum et al., 2014). Bisher konnte also zu den untersuchten Zeitpunkten der 10-tägigen Diät in der hoch KCl- und hoch KHCO_3 -Gruppe, im Gegensatz zur hoch KCitrat-Gruppe, keine Na^+ -Retention nachgewiesen werden. Jedoch kann zu einem anderen Zeitpunkt der Diäten eine renale Na^+ -Retention nicht ausgeschlossen werden. Erstaunlicherweise deuten neue Studienergebnissen auf eine sich rhythmisch ändernde Na^+ -Ausscheidung trotz gleichbleibender Na^+ -Aufnahme hin. So konnte im Zuge einer Raumfahrtsimulation eine täglich unterschiedliche Na^+ -Ausscheidung über den Urin der menschlichen Probanden

festgestellt werden, obwohl deren tägliche Na^+ -Aufnahme über die Nahrung konstant war. Tatsächlich ließ sich anhand der Ergebnisse eine sich rhythmisch ändernde Na^+ -Exkretion erkennen, bei der sich am 6.Tag der Diät ein Maximum der täglich ausgeschiedenen Na^+ -Menge darstellte (Rakova et al., 2013). In diesem Hinblick müssten die von uns durchgeführten Versuche nicht nur am 6. und 10.Tag der Diät, sondern konstant über einen längeren Zeitraum wiederholt werden.

Um eine vermutete Erhöhung des Plasmavolumens als mögliche Ursache der Hypertonie darstellen zu können, wurde dieses in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Evans Blue Verdünnungsmethode bestimmt. Dabei konnte in keiner der drei K^+ -Diätgruppen eine signifikante Erhöhung des Plasmavolumens festgestellt werden (Abb. 12). Oppermann et al. konnten mit Hilfe der Evans Blue Verdünnungsmethode einen Volumenanstieg von etwa 21% zwischen zwei verschiedenen Mäusegruppen nachweisen (Oppermann et al., 2010). Bei unseren Versuchen war die tatsächliche Streuung der Daten jedoch deutlich größer als von Oppermann et al. publiziert, sodass rückblickend mit der gemessenen Standardabweichung (als Schätzwert für die Varianz) und der vorliegenden Gruppengröße nur in der KHCO_3 -Gruppe eine zufriedenstellende Aussage erzielt werden konnte. Das heißt, dass in dieser Gruppe angenommen werden kann, dass der Fehler 2. Art (β -Fehler) kleiner als 20% ist. Da die Varianz in der hoch KCitrat-Gruppe sehr hoch war, wäre eine deutlich höhere Anzahl von Versuchstieren als 5 bis 7 pro Gruppe nötig, um eine Plasmavolumenexpansion in dieser Gruppe gesichert auszuschließen. Eine Berechnung mit dem Programm G*Power ergab, dass sich für eine Unterscheidung (d.h. mit einem Fehler 2. Art von unter 0,2) eines Plasmavolumenanstiegs von 20% in jeder Gruppe 23 Tiere untersucht werden sollten. Für die KCl-Gruppe sollte die Untersuchung auf mindestens 10 Tiere pro Diät erhöht werden, damit auch in dieser Gruppe die Aussage, dass keine Plasmavolumenerhöhung vorliegt, gesichert werden kann.

Bei einer Plasmavolumenexpansion kommt es durch eine Dehnung der Herzvorhofwände zur Ausschüttung von atrialem natriuretischen Peptid (ANP) aus den Vorhofmyocyten (de Bold, 1985). Aufgrund dieses Zusammenhangs wurde untersucht, ob ANP in den Tieren mit Bluthochdruck ebenfalls erhöht ist. Hierzu wurde die ANP-Konzentration mittels ELISA in Blutplasma am 10.Tag der Diät gemessen.

Doch auch hier wurde keine signifikante Erhöhung der ANP-Konzentration im Plasma der hoch Kalium-Tiere beobachtet (Abb. 14).

Weiterhin kann eine Volumenexpansion mit einer Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) einhergehen (Cervenka et al., 1999). Mitverantwortlich ist hierfür der sogenannte tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus (TGF). So kommt es aufgrund der EZV-Zunahme zu einer Sensitivitätsabnahme des Feedback-Mechanismus und zu einer Steigerung der GFR (Boron, 2005). Daher wurde die GFR anhand des Non-invasive-Clearance (NIC) Verfahrens ermittelt. Jedoch führt die hoch K^+ -Diät zu keiner signifikanten Steigerung der GFR (Abb. 15 und Tabelle 5). Ellery et al. beschreibt das verwendete Verfahren als äußerst genau und empfiehlt dieses für eine GFR-Messung an kleinen Säugetieren (Ellery et al., 2015). So ergaben Studien bei GFR-Messungen an Mäusen mit dem NIC-Verfahren Varianzkoeffizienten von 3-6,2% (Schock-Kusch et al., 2013) und 1-6% (Ellery et al., 2015). Vergleichbares konnten Giani et al. bei Basismessungen zwischen Wildtypmäusen und ACE10/10-Mäusen feststellen (Giani et al., 2014). Zusätzlich konnten sie nach medikamentös induzierter Nierenschädigung eine signifikante GFR-Abnahme von 21% ($p < 0,01$) bei ACE10/10-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen ohne Nierenschädigung entdecken. Die Standardabweichungen der GFR-Messungen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, lagen höher als die in der Literatur beschriebenen Varianzen. Eine GFR-Änderung bei den untersuchten Versuchsgruppen kann deshalb nicht gesichert ausgeschlossen werden, da die mit dem Programm G*Power Post hoc berechneten β -Fehler bei 74% bis 86% liegen.

Ein weiterer indirekter Hinweis auf eine Erhöhung des Plasmavolumens kann sich anhand einer Erniedrigung des Hämatokrits darstellen. So beschreiben Wall et al. einen erniedrigten Hämatokrit-Wert bei höherem Plasmavolumen in Wildtypmäusen im Vergleich zu Pendrin-Knockout-Mäusen (Wall et al., 2004). Von den drei untersuchten hoch Kaliumdiät-Gruppen zeigte sich nur bei einer, der hoch $KHCO_3$ -Gruppe, eine signifikante Erniedrigung des Hämatokrits (Abb. 13). Da der Hämatokrit auch von anderen Faktoren als dem Plasmavolumen abhängig ist, ist eine alleinige Erniedrigung dessen wenig aussagekräftig. So könnte dies auch auf eine aus bislang ungeklärten Gründen verminderte Erythropoese in der $KHCO_3$ -Gruppe zurückzuführen sein, da eine Veränderung der Erythropoese ebenso zur Änderung des Hämatokrits führt (Mahiny and Kariko, 2016).

Zusammenfassend konnte in der hoch KHCO_3 -Gruppe ein erniedrigter Hämatokrit und in der hoch KCitrat -Gruppe eine erhöhte Na^+ -Retention am 10.Tag der Diät als Hinweise für eine Plasmavolumenexpansion gefunden werden. Da in den beiden hoch Kaliumdiät-Gruppen, KCitrat und KHCO_3 , eine erhöhte mRNA-Expression von ENaC , Pendrin , NDCBE und AE4 nachgewiesen wurden (Böttcher, 2016), kann eine gesteigerte renale Na^+ -Retention in diesen Gruppen nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu konnte in der hoch KCl -Gruppe weder eine direkte Plasmavolumenexpansion noch indirekte Hinweise dafür, wie ein erhöhtes ANP oder eine erhöhte GFR, entdeckt werden. Zusätzlich konnte auch Böttcher (Böttcher, 2016) in dieser Gruppe keine signifikant erhöhte mRNA-Expression von ENaC finden, was ebenfalls gegen eine Aldosteron-induzierte renale Na^+ -Retention in dieser Gruppe sprechen könnte.

4.2. Säure-Base-Haushalt und dessen Einfluss auf die Na^+ -

Retention

Da die drei Anionen, welche in den unterschiedlichen Kalium-Diäten als Zusatz verwendet wurden, sich in den Basen- beziehungsweise Säurestärken unterscheiden wurde der Säure-Base-Status mittels Blut-Gas-Analyse (BGA) (2.2.6.) erfasst.

Nach der Gabe von Citrat als auch von HCO_3^- , die als schwache bzw. mittelstarke Base fungieren, wies die BGA-Analyse auf das Vorliegen einer metabolischen Alkalose hin (Tabelle 8). Während einer Alkalose kommen in der Niere vermehrt die Typ B Schaltzellen vor, welche mittels Pendrin für eine vermehrte HCO_3^- -Sekretion und somit für eine Regulierung des Säure-Base-Haushalts sorgen (1.2.). Das sezernierte HCO_3^- kann wiederum den ENaC direkt aktivieren und dessen Expression erhöhen (Pech et al., 2010), was zu einer vermehrten Na^+ -Retention führt. Zusätzlich könnte das im Tubuluslumen vermehrt vorkommende HCO_3^- über den apikalen Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (NDCBE) und den basolateral gelegenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter (AE4) für eine gesteigerte elektroneutrale, Thiazid-sensitive Na^+ -Retention in den Schaltzellen sorgen (1.2. und Abb. 2). Tatsächlich konnte Böttcher (Böttcher, 2016) eine gesteigerte mRNA-Expression von Pendrin , NDCBE , AE4 und ENaC in diesen beiden hoch Kalium-Gruppen, KCitrat und KHCO_3 finden, was den Verdacht einer gesteigerten Na^+ -Retention in diesen beiden Gruppen erhärtet. In der

vorliegenden Arbeit konnte jedoch weder in der KCitrat- noch in der KHCO_3 -Gruppe eine eindeutige Erhöhung des Plasmavolumens nachgewiesen werden (3.1.-3.3.). Eine renale Na^+ -Retention (3.3.2.) konnte lediglich zu einem Untersuchungszeitpunkt in der KCitrat-Gruppe festgestellt werden, ein verminderter Hämatokrit (3.1.2.) nur in der KHCO_3 -Gruppe. Daher kann derzeit in diesen beiden Gruppen eine renale Na^+ -Retention als Auslöser für den beobachteten Blutdruckanstieg weder gesichert angenommen noch ausgeschlossen werden.

Dem gegenüber sprechen die Ergebnisse der BGA-Analyse in der hoch KCl-Gruppe für keine Störung des Säure-Base-Haushaltes. Dementsprechend ist zu vermuten, dass in der hoch KCl-Gruppe keine vermehrte Aktivität der Typ B Schaltzellen vorliegt. Zusätzlich konnte Böttcher (Böttcher, 2016) in der hoch KCl-Gruppe keine gesteigerte mRNA-Expression von Pendrin, NDCBE, AE4 oder ENaC finden. Somit ist in der hoch KCl-Gruppe keine gesteigerte Na^+ -Retention über diese Transportmechanismen zu vermuten. Passend dazu wurde in der vorliegenden Arbeit auch kein Hinweis auf eine gesteigerte Na^+ -Retention oder Plasmavolumenexpansion (3.1.-3.3) als Ursache für den beobachteten Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe gefunden.

Aufgrund dessen wurde in der hoch KCl-Gruppe eine Herzfrequenz-Analyse (3.5.) durchgeführt, um eine gesteigerte Herzfrequenz als Ursache des Blutdruckanstieges auszuschließen.

4.3. Ist eine Herzfrequenzsteigerung für den Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe verantwortlich?

Da in der hoch KCl-Gruppe keine vermehrte mRNA-Expression des ENaCs (Böttcher, 2016), keine Na^+ -Retention und keine EZV-Expansion beobachtet werden konnte, wurde eine Herzfrequenzsteigerung, z.B. auf Grundlage einer gesteigerten Sympathikusaktivität (Sorota, 2014), als Ursache des beobachteten Blutdruckanstiegs unter der kombinierten hoch NaCl- (3%) hoch KCl (5%)-Diät in Betracht gezogen. Die Herzfrequenzen wurden mittels implantierter Telemetriesender erfasst (2.2.13.). Dies ist eine erfolgreiche und zuverlässige Messmethode zur Ermittlung von Herzfrequenzen und Blutdruckwerten über einen längeren Zeitraum. Da die Tiere von der Messung selbst nichts bemerken, kommt es zu keiner Beeinflussung der

erhobenen Daten, wie es ansonsten bei einer Stressreaktion der Fall wäre (Kurtz et al., 2005).

Insgesamt konnten keine Erhöhungen der nächtlichen Herzfrequenzen bei den Tieren in der hoch KCl-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe gefunden werden (Abb. 21). Jedoch zeigten alle Tiere ein circadianes Aktivitätsmuster, indem nachts höhere Herzfrequenzen als tagsüber gemessen wurden. Da Mäuse zu den nachtaktiven Tieren gehören, hängt dies mit der physiologischen und in der Nacht gesteigerten Aktivitätsphase der Tiere zusammen (Li et al., 1999).

Dem gegenüber fand Böttcher (Böttcher, 2016) in der hoch KCl-Gruppe eine signifikant gesteigerte Herzfrequenz. Daher wurde in einer weiteren Auswertung der Blutdruck in Abhängigkeit zur gemessenen Herzfrequenz betrachtet (Abb. 22). Hierbei zeigte sich ebenfalls kein Hinweis dafür, dass eine gesteigerte Herzfrequenz in der hoch KCl-Gruppe ursächlich für den beobachteten Blutdruckanstieg ist.

Da weder eine Erhöhung des Plasmavolumens noch eine gesteigerte Herzfrequenz in der hoch KCl-Gruppe nachgewiesen werden konnte, bleibt die Frage nach der Ursache des Blutdruckanstiegs offen. Ein erhöhtes Schlagvolumen (SV) oder ein gesteigerter peripherer Widerstand (TPR) sind als mögliche Auslöser noch in Betracht zu ziehen. Jedoch erlauben die bislang angewendeten Untersuchungsmethoden keine Aussage darüber. Eine Echokardiographie oder eine direkte Messung der Kontraktilität der Gefäße (Heinze et al., 2014) könnten möglicherweise zur Klärung der Ursachen beitragen.

4.4. Auswirkungen einer MR-Blockade auf den Blutdruck der hoch KCl-Gruppe

Aldosteron dient als eines der Schlüsselhormone des Flüssigkeitshaushaltes des Körpers und stellt daher auch ein beliebtes Ziel in der Hypertonietherapie dar (Shibata, 2016). Jedoch bewirkt Aldosteron nicht nur eine gesteigerte Na^+ -Retention im ASDN, sondern darüber hinaus kann eine erhöhte Aldosteronkonzentration über die Auswirkungen auf andere Organe einen Blutdruckanstieg hervorrufen. So kommt der MR nicht ausschließlich im ASDN, sondern auch im Herz, im Gehirn, in den Gefäßen und im Kolon vor (Shibata, 2016). Vor allem in den Gefäßen kommt es durch

Aldosteronstimulation zu Prozessen wie z.B. oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion, Entzündungsreaktionen und Umbauvorgängen, welche zum Blutdruckanstieg bei Hyperaldosteronismus beitragen können (Briet and Schiffrin, 2013). So konnte eine durch Aldosteron und hoch Na^+ -Diät ausgelöste arterielle Gefäßsteifigkeit durch eine selektive genetische Inaktivierung des MRs in glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC) verhindert werden. Dies könnte erklären, dass Patienten mit einem PA ein höheres Risiko besitzen ein kardiovaskuläres Ereignis zu entwickeln, als Patienten mit einem essentiellen Hypertonus (Milliez et al., 2005).

Da der Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe mit einer Erhöhung der Aldosteronkonzentration einherging, sollte die Auswirkung einer MR-Blockade untersucht werden. Jedoch konnte durch die medikamentöse MR-Blockade mittels Spironolacton der Blutdruckanstieg in der hoch KCl-Gruppe nicht verhindert werden (Abb. 25 und Abb. 27). Ähnliches konnte auch Vitzthum et al. (Vitzthum et al., 2014) feststellen, da in der hoch KCitrat-Gruppe der Blutdruckanstieg mittels Spironolacton ebenfalls nicht normalisiert werden konnte. Hierfür könnten MR-unabhängige Effekte des Aldosterons auf das Gefäßsystem verantwortlich sein, was der Grund für den frustrierten Therapieversuch mittels MR-Inhibitor erklären könnte. So führt Aldosteron über verschiedene Mechanismen zu einer rapiden Vasokonstriktion, welche sich nicht über eine Aktivierung des MRs erklären lassen (Briet and Schiffrin, 2013). Christ et al. (Christ et al., 1995) konnte einen Aldosteron-vermittelten Na^+ -Einstrom in VSMCs beobachten, welcher mittels Aldosteron-Antagonisten nicht verhindert werden konnte. Ebenso konnte Wehling et al. (Wehling et al., 1995) einen Aldosteron-abhängigen Effekt auf den Calcium-Haushalt der VSMCs entdecken, welcher sich nicht durch Spironolacton blockieren ließ. Des Weiteren könnte der MR-Blocker Spironolacton solche MR-unabhängigen Effekte sogar verstärken, da dieser zu einer Steigerung der Aldosteronkonzentration führen kann (Briet and Schiffrin, 2013).

4.5. Kalium-Haushalt

Da die Tiere aufgrund des sehr hohen K^+ -Gehalts im Futter hohe Mengen an Kalium zu sich nahmen, bestand die Gefahr einer zu starken Erhöhung der Kaliumkonzentration im Plasma. Daher wurde die Plasmakalium-Konzentration am 10.Tag

der Diäten bestimmt. Es konnte jedoch in keiner der drei hoch Kalium-Gruppen weder eine Hypo- noch eine Hyperkaliämie gefunden werden (Abb. 19). Da eine Hyperkaliämie zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen kann gibt es verschiedene Mechanismen, die extreme Konzentrationsschwankungen bei hoher K^+ -Aufnahme verhindern. So wird K^+ zum einen äußerst schnell in den Intrazellulärraum aufgenommen und zum anderen wird es nachfolgend rasch über die Nieren wieder ausgeschieden (Evans and Greenberg, 2005).

Bei allen von uns untersuchten hoch Kalium-Gruppen war am 6.Tag der Diät die K^+ -Ausscheidung signifikant erhöht (Abb. 16). Am 10.Tag fand sich auch in der hoch KCl- und der hoch $KHCO_3$ -Gruppe eine erhöhte K^+ -Ausscheidung. Diese konnte in der hoch KCitrat-Gruppe nicht mehr festgestellt werden (Tabelle 6). Allerdings könnte dies durch die geringere Anzahl der Tiere in der Gruppe bedingt sein ($n=4$), da Vitzthum et al. (Vitzthum et al., 2014) auch zwischen diesen beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied finden konnte. Somit zeigt sich, dass die Tiere auf die gesteigerte K^+ -Aufnahme mit einer gesteigerten renalen K^+ -Ausscheidung reagieren. Für die renale K^+ -Ausscheidung werden sowohl Aldosteron-abhängige als auch Aldosteron-unabhängige Mechanismen verantwortlich gemacht (Welling, 2013). Eine große Rolle bei der renalen K^+ -Sekretion spielen der ROMK und der Calcium-abhängige Maxi-Kalium-Kanal (BK). Beide werden durch eine hoch K^+ -Diät vermehrt aktiviert (Wang and Giebisch, 2009), letzterer wird sogar zusätzlich exprimiert (Estilo et al., 2008, Wang and Giebisch, 2009). Während der ROMK hauptsächlich für eine basale K^+ -Sekretion zuständig ist, erscheint der BK-Kanal für eine Fluss-induzierte K^+ -Sekretion verantwortlich zu sein (Najjar et al., 2005). So konnten Najjar et al. (Najjar et al., 2005) eine gesteigerte Fluss-induzierte K^+ -Sekretion in mikroperfundierten CCDs bei Hasen unter hoch K^+ -Diät nachweisen. Bislang ist unklar, ob in allen drei, in der vorliegenden Arbeit untersuchten hoch Kalium-Gruppen die beiden renalen K^+ -Sekretionswege in gleicher Weise zur Aufrechterhaltung der Kalium-Homöostase beitragen. In allen hoch Kalium-Gruppen war das Trink- und Urinvolumen stark erhöht. Dies würde somit eine Fluss-induzierte K^+ -Sekretion in allen Gruppen begünstigen. Die K^+ -Sekretion über den ROMK wird durch eine hohe Aktivität des ENaCs verstärkt (Pearce et al., 2015). Da jedoch die mRNA-Expression des ENaCs in den Gruppen unterschiedlich war (Böttcher, 2016), könnte der ROMK-Weg möglicherweise unterschiedlich stark zur Vermeidung der Hyperkaliämie in den drei hoch K^+ -Gruppen beitragen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Heutzutage geht man davon aus, dass dem blutdrucksenkenden Effekt einer gesteigerten Kalium-Zufuhr eine verringerte Na^+ -Retention durch eine verminderte Aktivierung des Thiazid-sensitiven Na^+ - Cl^- -Cotransporter im distalen Nephron der Niere zugrunde liegt. Jedoch ist eine hohe K^+ -Zufuhr gleichzeitig ein starker Stimulus zur Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Tatsächlich zeigten Mäuse einen Blutdruckanstieg und erhöhte Aldosteronkonzentrationen im Plasma unter kombinierter hoch (3%) NaCl - hoch (5%) K^+ -Diät. Deren Na^+ -Zufuhr ist vergleichbar mit der Na^+ -Zufuhr unter der heutigen sogenannten „Western diet“. Die Entwicklung des Blutdruckanstieges war unabhängig vom zugegebenen Anion (KCl , KCitrat und KHCO_3). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Mechanismen zum beobachteten Blutdruckanstieg bei den unterschiedlichen hoch (5%) K^+ -Diäten (KCl , KCitrat und KHCO_3) führen, wenn diese mit einer hoch (3%) NaCl -Diät kombiniert werden.

Hierfür erhielten Mäuse entweder eine normal (0,93%) K^+ -/hoch (3%) NaCl - oder eine hoch (5%) K^+ /hoch (3%) NaCl -Diät für jeweils zehn Tage mit den unterschiedlichen drei Anionen. Anhand verschiedener Versuche sollte eine mögliche renale Na^+ -Retention mit resultierender Plasmavolumenexpansion nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde unter kombinierter hoch (5%) KCl -/ hoch (3%) NaCl -Diät eine telemetrische Herzfrequenzuntersuchung durchgeführt. Ebenfalls unter kombinierter hoch (5%) KCl -/ hoch (3%) NaCl -Diät wurde der Einfluss einer MR-Blockade mittels Spironolacton auf den Blutdruck untersucht.

In keiner der hoch Kalium-Gruppen konnte mittels Indikatorverdünnungsmethode eine direkte Erhöhung des Plasmavolumens festgestellt werden. Jedoch konnten in der hoch KCitrat - und in der hoch KHCO_3 -Gruppe indirekte Hinweise für eine Plasmavolumenexpansion nachgewiesen werden. So zeigten sich in der hoch KCitrat -Gruppe am 10.Tag der Diät eine vermehrte Na^+ -Retention und in der hoch KHCO_3 -Gruppe ein erniedrigter Hämatokrit. Zusätzlich fand sich in beiden Gruppen eine metabolische Alkalose, was eine Na^+ -Retention begünstigen kann. Im Gegensatz dazu ließen sich in der hoch KCl -Gruppe weder eine direkte Plasmavolumenexpansion noch indirekte Hinweise hierfür darstellen. So könnte in der hoch KCl -Gruppe, im

Gegensatz zu den beiden anderen hoch Kalium-Gruppen, nicht eine Aldosteron-induzierte Na^+ -Retention, sondern eine andere Ursache für den beobachteten Blutdruckanstieg sein. Ein Anstieg der Herzfrequenz ist in der hoch KCl-Gruppe als Ursache auszuschließen, da gezeigt werden konnte, dass der Blutdruck unabhängig von der jeweils vorliegenden Herzfrequenz erhöht war. Zusätzlich konnte in der hoch KCl-Gruppe der Blutdruckanstieg anhand des MR-Blockers Spironolacton nicht normalisiert werden. Als Ursache für den Blutdruckanstieg könnten in der hoch KCl-Gruppe möglicherweise MR-unabhängige Wirkungen des erhöhten Aldosterons insbesondere auf das Gefäßsystem sein.

5.2. Summary of the results

High K^+ intake is thought to lower blood pressure by decreasing the activity of the thiazide-sensitive Na^+ - Cl^- -cotransporter in the distal nephron of the kidney and hence reducing renal Na^+ reabsorption. However, a high K^+ intake is also a potent stimulus for the release of aldosterone from the adrenal glands. Indeed, mice that received a combined high (5%) K^+ /high (3%) NaCl diet developed an increase in blood pressure and in aldosterone levels. Their Na^+ intake was raised to levels typically found in the Western diet. This dissertation should figure out whether the observed elevated blood pressure was caused by renal Na^+ retention and an increased plasma volume during a combined high K^+ /high NaCl diet.

Therefore, mice were subjected to either a normal (0.93%) K^+ /high (3%) Na^+ or high (5%) K^+ /high (3%) Na^+ diet for 10 days. To examine the influence of the co-administered anion three different K^+ diets (KCl, KCitrate, and KHCO_3) were used. To detect blood volume expansion different experiments were performed. Blood pressure and heart rate was determined using telemetry. To assess the contribution of MR signaling the effect of the MR antagonist spironolactone on blood pressure was examined.

After ten days of high K^+ /high NaCl diets the plasma volume was not increased in any group. We found indirect signs for an elevated plasma volume in two groups. This was an increased Na^+ retention in the high KCitrat-group and a decreased haematocrit in the high KHCO_3 -group. Additionally, both groups showed a metabolic alkalosis what could promote Na^+ -retention. In those two high K^+ -groups an aldosterone induced Na^+ -

retention can not be ruled out to be responsible for the observed increased blood pressure. On the contrary, there was no indirect sign for an elevated plasma volume in the high KCl-group. In addition, no elevated heart rate was found in this group. The observed elevated blood pressure was not normalized by using the mineralocorticoid-antagonist spironolactone. These findings demonstrate that the increase in blood pressure in the high KCl-group does not require MR activation and is not associated with elevated heart rate or plasma volume expansion. These findings suggest that changes in vascular resistance may play a dominant role in the pathogenesis of hypertension induced by a combined high KCl/high NaCl intake.

5.3. Ausblick

Da sich sowohl in der hoch KCitrat- als auch in der hoch KHCO_3 -Gruppe indirekte Hinweise auf eine gesteigerte renale Na^+ -Retention ergaben, sollte dieser weiter nachgegangen werden. So könnte eine erneute Untersuchung der Na^+ -Ausscheidung der Tiere über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass die Tiere während des metabolischen Käfigversuches einem großen Stressfaktor ausgesetzt sind und lange Versuche hiermit kritisch hinterfragt werden sollten. Da es bei einer gesteigerten renalen Na^+ -Retention zu einer Plasmavolumenexpansion und darüber zu einem größeren Schlagvolumen (SV) des Herzens kommen sollte (1.1.), könnte eine Untersuchung dessen aufschlussreich sein. So könnte eine Echokardiographie (Gao et al., 2011) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) (Baris et al., 2015) bei den Tieren entscheidende Hinweise für ein vergrößertes SV und somit für eine Plasmavolumenexpansion liefern.

Weil sich in der hoch KCl-Gruppe keine Hinweise sowohl für eine gesteigerte renale Na^+ -Retention mit resultierender Plasmavolumenexpansion als auch für eine Herzfrequenzsteigerung ergaben, müsste in dieser Gruppe der Fokus auf eine Veränderung der Gefäße gerichtet werden. Dahingehend könnte sich ein Versuch zur Messung der Kontraktilität (Heinze et al., 2014) und damit des totalen peripheren Widerstandes (TPR) als sinnvoll erweisen. Sollten sich in dieser Hinsicht Veränderungen ergeben, müsste geklärt werden, ob die erhöhte Aldosteronkonzentration über MR-unabhängige Mechanismen zur Erhöhung des TPR und somit zum Blutdruckanstieg führt.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
ADH	antidiuretisches Hormon
AE1	anion exchanger 1; Chlorid/Hydrogencarbonat-Austauscher
AE4	anion exchanger 4; Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -CoTransporter
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blut-Gas-Analyse
BK	Ca ²⁺ -abhängiger Maxi-Kaliumkanal
b.w.	Bodyweight; Körpergewicht
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CD	collecting duct; Sammelrohr
CCD	cortical collecting duct; kortikales Sammelrohr
°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
Cl ⁻	Chlorid
CNT	connecting tubule; Verbindungstubulus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Crea	Kreatinin
d	Tag
DASH	Dietary Approach to Stop Hypertension
DBP	diastolic blood pressure; diastolischer Blutdruck
DCT	distaler konvoluter Tubulus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
ESH	Europäische Gesellschaft für Hypertonie
EZV	effektiv zirkulierendes Volumen
FHht	familiäre hyperkaliämische Hypertonie

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
≥	größer gleich
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HF	Herzfrequenz
H ₂ O	Wasser
HWZ	Halbwertszeit
IC	intercalated cells; Schaltzellen
H ⁺	Proton
h	Stunde
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
Hg	Quecksilber
Hct	Hämatokrit
HZV	Herzzeitvolumen
K ⁺	Kalium
kg	Kilogramm
[x]	Konzentration des Stoffes x
l	Liter
m ²	Quadratmeter
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MCD	medullary collecting duct; medulläres Sammelrohr
min	Minute
mg	Miligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MK	Metabolischer Käfig
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mmHg	Milimeter Quecksilber
mmol	Milimol
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl

Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid; Kochsalz
NIC	Non-invasive Clearance
nm	Nanometer
NCC	Natrium-Chlorid-CoTransporter
NDCBE	Na ⁺ -dependent Cl ⁻ / HCO ₃ ⁻ exchanger; Na ⁺ -abhängigen Cl ⁻ / HCO ₃ ⁻ -Austauscher
Nedd4-2	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
NNR	Nebennierenrinde
O ₂	Sauerstoff
OH ⁻	Hydroxidion
OxSR1	oxidative stress response 1 Kinase
%	Prozent
p	Signifikantsniveau
P _a	Druck
PA	primärer Hyperaldosteronismus; Conn-Syndrom
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pH	potentia Hydrogenii
PV	Plasmavolumen
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	renal outer medullary potassium channel; renaler Kalium-Kanal
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
SBP	systolic blood pressure; systolischer Blutdruck
SBC/HCO ₃ ⁻ _{st}	Standardbikarbonat
SEM	standard error of the mean;
SGK1	Serum- und Glucocorticoid-regulierte Kinase 1
SPAK	Ste20p-related proline alanine-rich kinase
SV	Herzschlagvolumen
t	Zeitpunkt
TGF	tubuloglomerulärer Feedback-Mechanismus
TIU	Trypsin inhibitor unit; Trypsin-inhibitorische Einheit
TPR	total peripheral resistance; totaler peripherer Widerstand
VSMC	vascular smooth muscle cell; glatte Gefäßmuskelzelle

WNK	With-No-Lysine Kinase
z.B.	zum Beispiel
ZVD	zentralvenöser Druck

7. Literaturverzeichnis

- ABEGAZ, T. M., TEFERA, Y. G. & BEFEKADU ABEBE, T. 2017. Target Organ Damage and the Long Term Effect of Nonadherence to Clinical Practice Guidelines in Patients with Hypertension: A Retrospective Cohort Study. *Int J Hypertens*, 2017, 2637051.
- ABURTO, N. J., HANSON, S., GUTIERREZ, H., HOOPER, L., ELLIOTT, P. & CAPPUCCIO, F. P. 2013. Effect of increased potassium intake on cardiovascular risk factors and disease: systematic review and meta-analyses. *Bmj*, 346, f1378.
- ADDISON, W. L. 1928. The Use of Sodium Chloride, Potassium Chloride, Sodium Bromide, and Potassium Bromide in Cases of Arterial Hypertension which are Amenable to Potassium Chloride. *Can Med Assoc J*, 18, 281-5.
- AMAZIT, L., LE BILLAN, F., KOLKHOF, P., LAMRIBET, K., VIENGCHAREUN, S., FAY, M. R., KHAN, J. A., HILLISCH, A., LOMBES, M., RAFESTIN-OBLIN, M. E. & FAGART, J. 2015. Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *J Biol Chem*, 290, 21876-89.
- APPEL, L. J., BRANDS, M. W., DANIELS, S. R., KARANJA, N., ELMER, P. J. & SACKS, F. M. 2006. Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*, 47, 296-308.
- APPEL, L. J., GILES, T. D., BLACK, H. R., IZZO, J. L., JR., MATERSON, B. J., OPARIL, S. & WEBER, M. A. 2010. ASH position paper: dietary approaches to lower blood pressure. *J Am Soc Hypertens*, 4, 79-89.
- ARROYO, J. P., RONZAUD, C., LAGNAZ, D., STAUB, O. & GAMBA, G. 2011. Aldosterone Paradox: Differential Regulation of Ion Transport in Distal Nephron. *Physiology*, 26, 115-123.
- BARIS, O. R., EDERER, S., NEUHAUS, J. F., VON KLEIST-RETZOW, J. C., WUNDERLICH, C. M., PAL, M., WUNDERLICH, F. T., PEEVA, V., ZSURKA, G., KUNZ, W. S., HICKETHIER, T., BUNCK, A. C., STOCKIGT, F., SCHRICKEL, J. W. & WIESNER, R. J. 2015. Mosaic Deficiency in Mitochondrial Oxidative Metabolism Promotes Cardiac Arrhythmia during Aging. *Cell Metab*, 21, 667-77.
- BIANCHI, S., BATINI, V. & BIGAZZI, R. 2015. The renal effects of mineralocorticoid receptor antagonists. *International Journal of Cardiology*, 200, 20-24.
- BORON, W. B., E. 2005. *Medical physiology*, Philadelphia, Elsevier Saunders.
- BÖTTCHER, P. 2016. *Einfluss des Kalium- und Säure-Basen-Haushaltes auf den Blutdruck*. Med.Dissertation, Universität Hamburg.
- BRIET, M. & SCHIFFRIN, E. L. 2013. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res*, 50, 89-99.
- BUNDESAMT, S. 2017. Todesursachen in Deutschland. In: (DESTATIS), S. B. (ed.).
- CALHOUN, D. A., JONES, D., TEXTOR, S., GOFF, D. C., MURPHY, T. P., TOTO, R. D., WHITE, A., CUSHMAN, W. C., WHITE, W., SICA, D., FERDINAND, K., GILES, T. D., FALKNER, B. & CAREY, R. M. 2008. Resistant Hypertension: Diagnosis, Evaluation, and Treatment. *A Scientific Statement From the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*, 117, e510-e526.

- CASTRO, H. & RAIJ, L. 2013. Potassium in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Seminars in Nephrology*, 33, 277-289.
- CERVENKA, L., MITCHELL, K. D. & NAVAR, L. G. 1999. Renal function in mice: effects of volume expansion and angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*, 10, 2631-6.
- CHRIST, M., DOUWES, K., EISEN, C., BECHTNER, G., THEISEN, K. & WEHLING, M. 1995. Rapid Effects of Aldosterone on Sodium Transport in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension*, 25, 117-123.
- DE BOLD, A. 1985. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science*, 230, 767-770.
- DEBONNEVILLE, C., FLORES, S. Y., KAMYNNINA, E., PLANT, P. J., TAUXE, C., THOMAS, M. A., MÜNSTER, C., CHRAÏBI, A., PRATT, J. H., HORISBERGER, J. D., PEARCE, D., LOFFING, J. & STAUB, O. 2001. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *The EMBO Journal*, 20, 7052-7059.
- ELADARI, D., CHAMBREY, R., PICARD, N. & HADCHOUEL, J. 2014. Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 2879-2895.
- ELLERY, S. J., CAI, X., WALKER, D. D., DICKINSON, H. & KETT, M. M. 2015. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate in small rodents: through the skin for the win? *Nephrology (Carlton)*, 20, 117-23.
- ESTILO, G., LIU, W., PASTOR-SOLER, N., MITCHELL, P., CARATTINO, M. D., KLEYMAN, T. R. & SATLIN, L. M. 2008. Effect of aldosterone on BK channel expression in mammalian cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, F780-8.
- EVANS, K. J. & GREENBERG, A. 2005. Hyperkalemia: A Review. *Journal of Intensive Care Medicine*, 20, 272-290.
- GAO, S., HO, D., VATNER, D. E. & VATNER, S. F. 2011. Echocardiography in Mice. *Current protocols in mouse biology*, 1, 71-83.
- GIANI, J. F., JANJULIA, T., KAMAT, N., SETH, D. M., BLACKWELL, W. L., SHAH, K. H., SHEN, X. Z., FUCHS, S., DELPIRE, E., TOBLLI, J. E., BERNSTEIN, K. E., MCDONOUGH, A. A. & GONZALEZ-VILLALOBOS, R. A. 2014. Renal angiotensin-converting enzyme is essential for the hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition. *J Am Soc Nephrol*, 25, 2752-63.
- GRIMM, P. R., COLEMAN, R., DELPIRE, E. & WELLING, P. A. 2017. Constitutively Active SPAK Causes Hyperkalemia by Activating NCC and Remodeling Distal Tubules. *Journal of the American Society of Nephrology*.
- GROUP, T. S. R. 2015. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *New England Journal of Medicine*, 373, 2103-2116.
- HEIDENREICH, P. A., TROGDON, J. G., KHAVJOU, O. A., BUTLER, J., DRACUP, K., EZEKOWITZ, M. D., FINKELSTEIN, E. A., HONG, Y., JOHNSTON, S. C., KHERA, A., LLOYD-JONES, D. M., NELSON, S. A., NICHOL, G., ORENSTEIN, D., WILSON, P. W. F. & WOO, Y. J. 2011. Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States. *A Policy Statement From the American Heart Association*, 123, 933-944.
- HEINZE, C., SENIUK, A., SOKOLOV, M. V., HUEBNER, A. K., KLEMENTOWICZ, A. E., SZIJARTO, I. A., SCHLEIFENBAUM, J., VITZTHUM, H., GOLLASCH, M., EHMKE, H., SCHROEDER, B. C. & HUBNER, C. A. 2014. Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure. *J Clin Invest*, 124, 675-86.

- JAHNSEN, K. S., H.; STARKER, A. 2008. Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Hypertonie. In: BUNDESAMT, S. (ed.). Berlin: Robert Koch-Institut.
- KLINKE, R. P., H.-S.; KURTZ, A.; SILBERNAGL, S. 2010. *Physiologie*, Stuttgart.
- KNEPPER, M. A. & INOUE, T. 1997. Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 560-564.
- KURTZ, T. W., GRIFFIN, K. A., BIDANI, A. K., DAVISSON, R. L. & HALL, J. E. 2005. Recommendations for Blood Pressure Measurement in Humans and Experimental Animals. Part 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals. A Statement for Professionals From the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research, 25, e22-e33.
- LI, P., SUR, S. H., MISTLBERGER, R. E. & MORRIS, M. 1999. Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276, R500-R504.
- MAHINY, A. J. & KARIKO, K. 2016. Measuring Hematocrit in Mice Injected with In Vitro-Transcribed Erythropoietin mRNA. *Methods Mol Biol*, 1428, 297-306.
- MANCIA, G., FAGARD, R., NARKIEWICZ, K., REDON, J., ZANCHETTI, A., BÖHM, M., CHRISTIAENS, T., CIFKOVA, R., DE BACKER, G., DOMINICZAK, A., GALDERISI, M., GROBBEE, D. E., JAARSMA, T., KIRCHHOF, P., KJELDSSEN, S. E., LAURENT, S., MANOLIS, A. J., NILSSON, P. M., RUILOPE, L. M., SCHMIEDER, R. E., SIRNES, P. A., SLEIGHT, P., VIIGIMAA, M., WAEBER, B., ZANNAD, F., REDON, J., DOMINICZAK, A., NARKIEWICZ, K., NILSSON, P. M., BURNIER, M., VIIGIMAA, M., AMBROSIONI, E., CAUFIELD, M., COCA, A., OLSEN, M. H., SCHMIEDER, R. E., TSIOUFIS, C., VAN DE BORNE, P., ZAMORANO, J. L., ACHENBACH, S., BAUMGARTNER, H., BAX, J. J., BUENO, H., DEAN, V., DEATON, C., EROL, C., FAGARD, R., FERRARI, R., HASDAI, D., HOES, A. W., KIRCHHOF, P., KNUUTI, J., KOLH, P., LANCELLOTTI, P., LINHART, A., NIHOYANNOPOULOS, P., PIEPOLI, M. F., PONIKOWSKI, P., SIRNES, P. A., TAMARGO, J. L., TENDERA, M., TORBICKI, A., WIJNS, W., WINDECKER, S., CLEMENT, D. L., COCA, A., GILLEBERT, T. C., TENDERA, M., ROSEI, E. A., AMBROSIONI, E., ANKER, S. D., BAUERSACHS, J., HITIJ, J. B., CAULFIELD, M., DE BUYZERE, M., DE GEEST, S., DERUMEAUX, G. A., ERDINE, S., FARSANG, C., FUNCK-BRENTANO, C., GERC, V., GERMANO, G., GIELEN, S., HALLER, H., HOES, A. W., JORDAN, J., KAHAN, T., KOMAJDA, M., LOVIC, D., MAHRHOLDT, H., OLSEN, M. H., OSTERGREN, J., PARATI, G., PERK, J., POLONIA, J., POPESCU, B. A., REINER, Ž., RYDÉN, L., SIRENKO, Y., STANTON, A., et al. 2013. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 34, 2159-2219.
- MANGER, W. M., SIMCHON, S., STIER, C. T., JR., LOSCALZO, J., JAN, K. M., JAN, R. & HADDY, F. 2003. Protective effects of dietary potassium chloride on hemodynamics of Dahl salt-sensitive rats in response to chronic administration of sodium chloride. *J Hypertens*, 21, 2305-13.
- MENETON, P., LOFFING, J. & WARNOCK, D. G. 2004. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 287, F593-F601.

- MENTE, A., O'DONNELL, M. J., RANGARAJAN, S., MCQUEEN, M. J., POIRIER, P., WIELGOSZ, A., MORRISON, H., LI, W., WANG, X., DI, C., MONY, P., DEVANATH, A., ROSENGREN, A., OGUZ, A., ZATONSKA, K., YUSUFALI, A. H., LOPEZ-JARAMILLO, P., AVEZUM, A., ISMAIL, N., LANAS, F., PUOANE, T., DIAZ, R., KELISHADI, R., IQBAL, R., YUSUF, R., CHIFAMBA, J., KHATIB, R., TEO, K. & YUSUF, S. 2014. Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. *N Engl J Med*, 371, 601-11.
- MILLIEZ, P., GIRERD, X., PLOUIN, P. F., BLACHER, J., SAFAR, M. E. & MOURAD, J. J. 2005. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*, 45, 1243-8.
- MONTICONE, S., ELSE, T., MULATERO, P., WILLIAMS, T. A. & RAINEY, W. E. 2015. Understanding primary aldosteronism: impact of next generation sequencing and expression profiling. *Mol Cell Endocrinol*, 399, 311-20.
- MOZAFFARIAN, D., BENJAMIN, E. J., GO, A. S., ARNETT, D. K., BLAHA, M. J., CUSHMAN, M., DAS, S. R., DE FERRANTI, S., DESPRÉS, J.-P., FULLERTON, H. J., HOWARD, V. J., HUFFMAN, M. D., ISASI, C. R., JIMÉNEZ, M. C., JUDD, S. E., KISSELA, B. M., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., LIU, S., MACKAY, R. H., MAGID, D. J., MCGUIRE, D. K., MOHLER, E. R., MOY, C. S., MUNTNER, P., MUSSOLINO, M. E., NASIR, K., NEUMAR, R. W., NICHOL, G., PALANIAPPAN, L., PANDEY, D. K., REEVES, M. J., RODRIGUEZ, C. J., ROSAMOND, W., SORLIE, P. D., STEIN, J., TOWFIGHI, A., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WOO, D., YEH, R. W. & TURNER, M. B. 2016. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *A Report From the American Heart Association*, 133, e38-e360.
- NAJJAR, F., ZHOU, H., MORIMOTO, T., BRUNS, J. B., LI, H.-S., LIU, W., KLEYMAN, T. R. & SATLIN, L. M. 2005. Dietary K⁺ regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 289, F922-F932.
- NISHIMOTO, M. & FUJITA, T. 2015. Renal mechanisms of salt-sensitive hypertension: contribution of two steroid receptor-associated pathways. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 308, F377-F387.
- O'DONNELL, M., MENTE, A., RANGARAJAN, S., MCQUEEN, M. J., WANG, X., LIU, L., YAN, H., LEE, S. F., MONY, P., DEVANATH, A., ROSENGREN, A., LOPEZ-JARAMILLO, P., DIAZ, R., AVEZUM, A., LANAS, F., YUSOFF, K., IQBAL, R., ILOW, R., MOHAMMADIFARD, N., GULEC, S., YUSUFALI, A. H., KRUGER, L., YUSUF, R., CHIFAMBA, J., KABALI, C., DAGENAIS, G., LEAR, S. A., TEO, K. & YUSUF, S. 2014. Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events. *N Engl J Med*, 371, 612-23.
- OMURA, M., SAITO, J., YAMAGUCHI, K., KAKUTA, Y. & NISHIKAWA, T. 2004. Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertens Res*, 27, 193-202.
- OPPERMANN, M., GESS, B., SCHWEDA, F. & CASTROP, H. 2010. Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol*, 21, 468-77.
- PALMER, L. G. & SCHNERMANN, J. 2015. Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10, 676-87.
- PASCUAL-LE TALLEC, L. & LOMBES, M. 2005. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol*, 19, 2211-21.

- PEARCE, D., SOUNDARARAJAN, R., TRIMPERT, C., KASHLAN, O. B., DEEN, P. M. T. & KOHAN, D. E. 2015. Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 10, 135-146.
- PECH, V., PHAM, T. D., HONG, S., WEINSTEIN, A. M., SPENCER, K. B., DUKE, B. J., WALP, E., KIM, Y. H., SUTLIFF, R. L., BAO, H. F., EATON, D. C. & WALL, S. M. 2010. Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO₃. *J Am Soc Nephrol*, 21, 1928-41.
- PENTON, D., CZOGALLA, J. & LOFFING, J. 2015. Dietary potassium and the renal control of salt balance and blood pressure. *Pflugers Arch*, 467, 513-30.
- PENTON, D., CZOGALLA, J., WENGI, A., HIMMERKUS, N., LOFFING-CUENI, D., CARREL, M., RAJARAM, R. D., STAUB, O., BLEICH, M., SCHWEDA, F. & LOFFING, J. 2016. Extracellular K⁺ rapidly controls NaCl cotransporter phosphorylation in the native distal convoluted tubule by Cl⁻-dependent and independent mechanisms. *J Physiol*, 594, 6319-6331.
- PUAR, T. H., MOK, Y., DEBAJYOTI, R., KHOO, J., HOW, C. H. & NG, A. K. 2016. Secondary hypertension in adults. *Singapore Med J*, 57, 228-32.
- RAKOVA, N., JÜTTNER, K., DAHLMANN, A., SCHRÖDER, A., LINZ, P., KOPP, C., RAUH, M., GOLLER, U., BECK, L., AGUREEV, A., VASSILIEVA, G., LENKOVA, L., JOHANNES, B., WABEL, P., MOISSEL, U., VIENKEN, J., GERZER, R., ECKARDT, K.-U., MÜLLER, DOMINIK N., KIRSCH, K., MORUKOV, B., LUFT, FRIEDRICH C. & TITZE, J. 2013. Long-Term Space Flight Simulation Reveals Infradian Rhythmicity in Human Na⁺ Balance. *Cell Metabolism*, 17, 125-131.
- RENGARAJAN, S., LEE, D. H., OH, Y. T., DELPIRE, E., YOUN, J. H. & MCDONOUGH, A. A. 2014. Increasing plasma [K⁺] by intravenous potassium infusion reduces NCC phosphorylation and drives kaliuresis and natriuresis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306, F1059-68.
- RIEG, T., VALLON, V., SAUSBIER, M., SAUSBIER, U., KAISLING, B., RUTH, P. & OSSWALD, H. 2007. The role of the BK channel in potassium homeostasis and flow-induced renal potassium excretion. *Kidney Int*, 72, 566-73.
- ROSSIER, B. C., STAUB, O. & HUMMLER, E. 2013. Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: importance in the control of blood pressure and hypertension. *FEBS Lett*, 587, 1929-41.
- SACKS, F. M., SVETKEY, L. P., VOLLMER, W. M., APPEL, L. J., BRAY, G. A., HARSHA, D., OBARZANEK, E., CONLIN, P. R., MILLER, E. R., 3RD, SIMONS-MORTON, D. G., KARANJA, N. & LIN, P. H. 2001. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med*, 344, 3-10.
- SARITAS, T., BORSCHESKI, A., MCCORMICK, J. A., PALIEGE, A., DATHE, C., UCHIDA, S., TERKER, A., HIMMERKUS, N., BLEICH, M., DEMARETZ, S., LAGHMANI, K., DELPIRE, E., ELLISON, D. H., BACHMANN, S. & MUTIG, K. 2013. SPAK Differentially Mediates Vasopressin Effects on Sodium Cotransporters. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24, 407-418.
- SCHOCK-KUSCH, D., GERACI, S., ERMELING, E., SHULHEVICH, Y., STICHT, C., HESSER, J., STSEPANKOU, D., NEUDECKER, S., PILL, J., SCHMITT, R. & MELK, A. 2013. Reliability of transcutaneous measurement of renal function in various strains of conscious mice. *PLoS One*, 8, e71519.

- SHIBATA, S. 2016. Context-dependent mechanisms modulating aldosterone signaling in the kidney. *Clin Exp Nephrol*, 20, 663-670.
- SINGH, R. B., SINGH, N. K., MODY, R. & CAMERON, E. A. 1987. Does sodium play an adverse role in hypertension? *Acta Cardiol*, 42, 187-206.
- SORENSEN, M. V., GROSSMANN, S., ROESINGER, M., GRESKO, N., TODKAR, A. P., BARMETTLER, G., ZIEGLER, U., ODERMATT, A., LOFFING-CUENI, D. & LOFFING, J. 2013. Rapid dephosphorylation of the renal sodium chloride cotransporter in response to oral potassium intake in mice. *Kidney Int*, 83, 811-24.
- SOROTA, S. 2014. The sympathetic nervous system as a target for the treatment of hypertension and cardiometabolic diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 63, 466-76.
- STEWART, P. M. 1999. Mineralocorticoid hypertension. *Lancet*, 353, 1341-7.
- SUNIL, K. N., MUZAHIR, H. T., FRANZ, M. & GREGORY, Y. H. L. 2006. Target Organ Damage in Hypertension: Pathophysiology and Implications for Drug Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 1581-1592.
- TERKER, A. S. & ELLISON, D. H. 2015. Renal mineralocorticoid receptor and electrolyte homeostasis. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309, R1068-R1070.
- TERKER, A. S., ZHANG, C., MCCORMICK, J. A., LAZELLE, R. A., ZHANG, C., MEERMEIER, N. P., SILER, D. A., PARK, H. J., FU, Y., COHEN, D. M., WEINSTEIN, A. M., WANG, W. H., YANG, C. L. & ELLISON, D. H. 2015. Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride. *Cell Metab*, 21, 39-50.
- THEILIG, F. & WU, Q. 2015. ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 308, F1047-F1055.
- UEDA, K., FUJIKI, K., SHIRAHIGE, K., GOMEZ-SANCHEZ, C. E., FUJITA, T., NANGAKU, M. & NAGASE, M. 2014. Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445, 132-137.
- VILELA, L. A. P. & ALMEIDA, M. Q. 2017. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *Arch Endocrinol Metab*, 61, 305-312.
- VITZTHUM, H., SENIUK, A., SCHULTE, L. H., MULLER, M. L., HETZ, H. & EHMKE, H. 2014. Functional coupling of renal K⁺ and Na⁺ handling causes high blood pressure in Na⁺ replete mice. *J Physiol*, 592, 1139-57.
- WALL, S. M. 2016. The role of pendrin in blood pressure regulation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 310, F193-203.
- WALL, S. M., KIM, Y. H., STANLEY, L., GLAPION, D. M., EVERETT, L. A., GREEN, E. D. & VERLANDER, J. W. 2004. NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl⁻ conservation. *Hypertension*, 44, 982-7.
- WALL, S. M. & LAZO-FERNANDEZ, Y. 2015. The role of pendrin in renal physiology. *Annu Rev Physiol*, 77, 363-78.
- WANG, W. H. & GIEBISCH, G. 2009. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch*, 458, 157-68.
- WEHLING, M., NEYLON, C. B., FULLERTON, M., BOBIK, A. & FUNDER, J. W. 1995. Nongenomic Effects of Aldosterone on Intracellular Ca²⁺ in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 76, 973-979.

- WELLING, P. A. 2013. Regulation of renal potassium secretion: molecular mechanisms. *Semin Nephrol*, 33, 215-28.
- WHO 2014. World Health Statistics 2014 Part III: Global health indicators. *In: ORGANIZATION, W. H. (ed.)*.
- ZANCHETTI, A., DOMINICZAK, A., COCA, A., TSIOUFIS, C., CLEMENT, D. L., AGABITI ROSEI, E., SHLYAKHTO, E., MAHFOUD, F., RUSCHITZKA, F., DE SIMONE, G., LIP, G. Y. H., DESORMAIS, I., REDON, J., NARKIEWICZ, K., RUILOPE, L., KERINS, M., AZIZI, M., BURNIER, M., KREUTZ, R., MCMANUS, R., SCHMIEDER, R. E., LAURENT, S., KJELDSSEN, S. E., KAHAN, T., ABOYANS, V., SPIERING, W., WILLIAMS, B., MANCIA, G. & GROUP, E. S. D. 2018. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 39, 3021-3104.

8. Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen

Es sind keine Vorveröffentlichungen vorhanden.

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Ehmke, dass er mir in seinem Institut das Absolvieren einer spannenden Dissertation und einen Einblick in die Forschung ermöglicht hat. Zusätzlich bedanke ich mich für die Möglichkeit auch über die Dissertation hinaus am Institut für zelluläre und integrative Physiologie IZIP tätig gewesen zu sein.

Hervorheben möchte ich Frau Dr. rer. nat. H. Vitzthum, welche als meine Betreuerin durch ihre ununterbrochene Unterstützung und Hilfsbereitschaft zum Gelingen der Dissertation entscheidend beigetragen hat. Besonders dankbar bin ich für die Planung und Unterstützung beim Durchführen der Versuche, für ein stets offenes Ohr für meine Fragen und für Ihre außerordentliche Motivationsfähigkeit. Ohne Sie wäre die Dissertation nicht in diesem Rahmen entstanden.

Bei Frau Dr. med. A. Seniuk bedanke ich mich für das Durchführen der Telemetrie-Operationen in den Versuchen und die aufgebrauchte Zeit für das Projekt.

Frau C. Kollien spreche ich meinen Dank für Ihr Organisationstalent rund um die Dissertation und meine Tutoren-/Dozenten-Tätigkeit am Institut für zelluläre und integrative Physiologie IZIP aus.

Für die Einarbeitung im Labor und Unterstützung bei der Auswertung des ANP-ELISAs möchte ich Frau T. Kock bedanken.

Für das Beheben sämtlicher technischer Probleme danke ich Herrn Dipl.-Ing. P. Bassalay.

Allen nichtgenannten Mitarbeitern des Instituts danke ich für deren tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Zuletzt möchte ich mich für die stetige und unverzichtbare Unterstützung bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin bedanken.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: