

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik D
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Pavenstädt
AG Experimentelle Nephrologie
Leiter Prof. Dr. E. Schlatter

**Untersuchungen zur „repaired defect“ Hypothese
der glomerulären Kapillarwand.**

Experimentelle und klinische Untersuchungen zu klinischen
Analogien.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Repp, Viktor

aus Osakarowka (Kasachstan)

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. E. Schlatter

2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. Dr. H. Hohage

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik D
Direktor Univ.-Prof. Dr. H. Pavenstädt
AG Experimentelle Nephrologie
Leiter Prof. Dr. E. Schlatter

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur „repaired defect“ Hypothese der glomerulären Kapillarwand.

Experimentelle und klinische Untersuchungen zu klinischen Analogien.

Repp, Viktor

Gerinnungsdefekte können zu einer erhöhten Permeabilität von Kapillarendothel führen. Da verwundert nicht, dass glomeruläre Kapillaren, die unter einem erhöhten hydrostatischen Druck stehen, mögliche Quelle für eine Mikro- oder Makrohämaturie sind, z.B. unter einer Antikoagulantientherapie. An drei Patientenkollektiven unter Marcumar, ASS und ASS/ Clopidogrel sowie einem Kontrollkollektiv wurden die Mikrohämaturie quantitativ analysiert und Unterschiede statistisch gesichert. Die klinischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mikrohämaturie ein sensibler Indikator für ein gestörtes Gerinnungspotential ist.

Ein experimentelles Modell, an dem der Mechanismus zur Entstehung einer Mikrohämaturie studiert werden kann, ist eine isolierte, zellfrei perfundierte Niere. Durch Untersuchungen am Modell der isoliert perfundierten Niere der Ratte (genehmigt durch LANUV NRW am 05.12.2011, Aktenzeichen: 84-02.05.20.11.257) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es bei zellfreier Perfusion zu einer exponentiellen Abnahme der Ausscheidung noch in der Niere verbliebener roter Blutzellen über den Urin kommt, die umso schneller erfolgt, je höher die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und das Urinzeitvolumen sind. Die höchsten Filtrate und Urinzeitvolumina wurden mit kolloidfrei perfundierten Nieren im „single pass“ Modus erzielt. Setzt man im Perfusionsmodus der Rezirkulation bovines Serumalbumin als Kolloid ein, sind GFR und Urinzeitvolumina geringer und die exponentielle Abnahme der Ausscheidung roter Blutzellen wird demgegenüber verzögert. Setzt man jetzt diesem Perfusat nur 5 % Erythrozyten hinzu, fällt die Ausscheidung auf ein bleibendes Niveau von ca. 100 Zellen/min ab, was um Faktor 100 höher als im Stoffwechsellkäfig in vivo liegt.

Zusammen mit früher erhobenen Untersuchungsbefunden zur mehrfach höheren Ausscheidung von Albumin an diesem experimentellen Modell kann die 1986 erstmals formulierte Hypothese der „repaired defects“ weiter unterstützt werden, die davon ausgeht, dass glomeruläre Kapillaren kleinere und größere Defekte aufweisen, die unter in vitro Bedingungen mit fehlendem Gerinnungspotential und der „einfachen“ Perfusat-Rezeptur demaskiert werden, was die höhere Proteinpermeabilität erklären könnte und bei Erythrozytenzusatz die Hämaturie durch Defekte, die unter in vivo Bedingungen dagegen überwiegend abgedichtet sind. Dies könnte dabei helfen pathophysiologische und klinische Phänomene wie Belastungs-Proteinurie und Belastungs-Hämaturie besser zu erklären, die es in vielerlei Varianten gibt.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hämaturie: glomerulär oder nicht-glomerulär	1
1.2. Experimentelle Grundlage zur Hypothese der „repaired defects“ am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere (IPRK) und Literatur-Übersicht	1
1.3. Zunahme der Permeabilität für Protein in der Übergangsphase in vivo - ex vivo. Darstellung bisher vorliegender Befunde	3
1.4. Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere	5
1.5. Glomeruläre Proteinpermeabilität in vivo	9
1.6. Besonderheiten der glomerulären Proteinpermeabilität ex vivo	10
1.7. Fragestellung der Arbeit: Analyse der Dynamik der Mikro-hämaturie ex vivo bei zellfreier Perfusionslösung und bei Zusatz von Erythrozyten	13
1.8. Klinische Korrelate zu den experimentellen Befunden	14
1.8.1. Proteinurie	15
1.8.2. Hämaturie	17
2. Experimentelle Methodik	22
2.1. Versuchstiere und Präparationstechnik zur Isolierung der Nieren	22
2.2. Perfusionstechnik mit Rezirkulation des Perfusates ohne und mit Erythrozyten	27
2.3. Perfusionstechnik im “single pass“ Modus ohne Erythrozyten	29
2.4. Funktionsanalyse der isolierten Niere	31
2.5. Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig	31
2.6. Technik der Zellzählung mit Hilfe der Zählkammer	31

3. Patienten und Methodik	36
Patientenkollektive:	
a) Kontrollkollektiv	
b) Patienten unter Antikoagulantien	
4. Ergebnisse	37
4.1. Experimentell erhobene Daten zur Dynamik der Mikrohämaturie	37
4.1.1. Single pass Modus mit zellfreier Perfusion	40
4.1.2. Rezirkulationsmodus ohne und mit Erythrozytenzusatz	41
4.1.3. Untersuchungen zur Mikrohämaturie im Stoffwechsellkäfig	44
4.1.4. Tubulusepithelien im Urinsediment	48
4.2. Daten der Patientenkollektive	50
4.2.1. Kontrollkollektiv	50
4.2.2. Phenprocoumon (Marcumar®)	54
4.2.3. Acetylsalicylsäure (ASS)	56
4.2.4. Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel	58
4.2.5. Übersicht der Ergebnisse zur Hämaturie unter Antikoagulantien	60
5. Diskussion	63
5.1. Zum experimentellen Modell	63
5.2. Zu den experimentellen Befunden	70
5.3. Der Bezug zu klinischen Phänomenen	79
5.3.1. Proteinurie und funktionelle Proteinurie	79
5.3.2. Die Mikrohämaturie bei der Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran	82
5.3.3. Die Mikrohämaturie unter der Wirkung von Antikoagulantien	83
6. Zusammenfassung	85
7. Literaturverzeichnis	88
8. Tabellarium	98
9. Danksagung	

10. Curriculum vitae

11. Erklärung nach §2 Abs. 4 der Promotionsordnung

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Untersuchungen zur „repaired defect“ Hypothese der glomerulären Kapillarwand.

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster,

Medizinische Klinik D, Direktor Univ.-Prof. Dr. H. Pavenstädt,

AG Experimentelle Nephrologie, Leiter Prof. Dr. E. Schlatter

unter der Anleitung von:

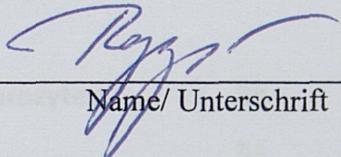
Prof. Dr. E. Schlatter

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Lingen, 01.09.2015

Ort, Datum

Viktor Repp


Name/ Unterschrift

1. Einleitung

1.1. Hämaturie: glomerulär oder nicht-glomerulär

Mit diesem Titel haben Birch und Fairley in Australien Geschichte geschrieben und dies mit einem sehr gewöhnlichen Problem des klinischen Alltags. In dem kurzen Artikel, der 1979 im Lancet erschien (9), haben sie eine sehr prägnante Handlungsanweisung gegeben, wie man bei einer Hämaturie - ob makroskopisch oder nur mikroskopisch sichtbar - vorgeht, um nicht der Forderung von Campbell's Urology, dem führenden Handbuch im angelsächsischen Raum zu folgen: „wie trivial eine Blutung auch immer scheinen mag, eine komplette urologische Untersuchung ist zwingend erforderlich“.

Besteht neben der Hämaturie eine Proteinurie kann man eine glomeruläre Erkrankung annehmen. Ohne Proteinurie aber werden Patienten mit einer dennoch bestehenden Glomerulonephritis unnötig einer umfangreichen urologischen Diagnostik unterworfen, wo doch eine Nierenbiopsie das zielführende diagnostische Werkzeug wäre. Was dann folgt hat in den Folgejahren zu einer Renaissance der Urinmikroskopie geführt mit der technischen Variante der Phasenkontrastmikroskopie. Die von Birch und Fairley beschriebenen Zellatypien, die bei glomerulären Erkrankungen häufig zu sehen sind, lassen sich gut von den unbeschädigten Erythrozyten aus postrenalen Quellen unterscheiden, ob sie nun roten Blutfarbstoff enthalten oder als Geisterzellen ohne Hämoglobin erscheinen (9; 19; 20). In den folgenden Jahrzehnten ist immer wieder darauf Bezug genommen worden (10; 19; 35; 36; 40-42; 58), auch mit weiterer Differenzierung (26; 33-36).

1.2. Experimentelle Grundlagen zur Hypothese der „repaired defects“ am Modell der isoliert perfundierten Ratten-Niere (IPRK)

Durch Untersuchungen an der zellfrei isoliert perfundierten Rattenniere (IPRK) wurde gezeigt, dass es bereits 10 Minuten nach Perfusionsbeginn zu einer

deutlich erhöhten glomerulären Albuminpermeabilität kommt (s. Abb. 1.1.). Zur Klärung der Frage, was zu der geringeren Makromolekül-Permeabilität in vivo beiträgt im Vergleich zur isoliert perfundierten Niere wurden u.a. in der Arbeitsgruppe von Schurek in Hannover systematisch Experimente mit Albumin- und/ oder Erythrozyten-Zusatz durchgeführt (72; 73; 75; 77; 78; 81). Ein klinisches Äquivalent inverser Richtung war die Beobachtung von Stefanidis (83; 84), dass in der Frühphase nach Nierentransplantation (die Niere wird zuvor zellfrei vorgespült konserviert) eine initial sehr hohe Proteinurie besteht, die sich exponentiell drastisch reduziert und innerhalb von 24h sich zu Normalwerten hin entwickelt.

Bei der Perfusion von Rattennieren mit Albumin als dem alleinigen Protein lag die Albuminurie um Faktor 10-20 höher als in vivo (72; 81; 87; 88). Die durchgeführte Analyse von frühproximalen Mikropunktionsproben zeigte im Unterschied zu in vivo Verhältnissen eine schiefe Häufigkeitsverteilung mit einem Gipfel im niedrigen Bereich bis 4 mg/dl und ca. 16% hohe Einzelwerte von über 30 mg/dl. Die gleiche schiefe Häufigkeitsverteilung wurde in vivo von Eisenbach bei der hämodynamischen Störung in Folge einer Angiotensin II Wirkung beschrieben (18). Nach längerer Perfusionszeit (ab 1 Stunde) fanden sich in einigen Nephronen vermehrt proximale Resorptionsvakuolen als Ausdruck einer erhöhten Proteinresorption bei dort erhöhter glomerulärer Durchlässigkeit (81). Die Perfusionen mit Albumin/ γ Globulin bzw. Vollplasma zeigten keine Beeinflussung der beschriebenen Permeabilitätserhöhung. Dagegen hatte die Zugabe von 5% Erythrozyten eine deutliche Reduktion der Albuminpermeabilität zur Folge (55; 56). Dies war begleitet von einer über die Versuchsdauer anhaltenden Mikrohämaturie (72; 81). In einer 1981 publizierten Arbeit hat Swanson darauf hingewiesen, dass die mit der Versuchsdauer ansteigende Proteinurie an der IPRK durch Erythrozytenzusatz begrenzt werden kann (89). Unter Berücksichtigung der oben genannten Phänomene wurde 1986 von Schurek et al. (72) die „repaired defect“ Hypothese der glomerulären Kapillarwand formuliert: die glomerulären Kapillaren weisen vereinzelt „physiologische Membrandefekte“ auf, die durch „Reparationsmechanismen“ des Organismus abgedichtet werden (Gerinnungs-

faktoren, Makromoleküle, Kittsubstanzen, zelluläre Elemente). Unterbleibt der Nachschub an "Reparationsmaterial" wie bei zellfreier Perfusion mit Albumin, werden die maskierten Defekte freigelegt und man findet als Ausdruck dessen u.a. mit dem Herauslösen von "Abdichtungserythrozyten" aus der Kapillarwand eine exponentiell abnehmende Mikrohämaturie und eine zunehmende Proteinurie. Andererseits führt der Zusatz von Erythrozyten zum Perfusat dazu, dass einzelne größere Defekte wieder abgedichtet werden mit dem Resultat einer verminderten Permeabilität für Protein; die verbleibenden größeren Defekte unterhalten die Mikrohämaturie durch permanente Durchwanderung immer wieder nachfolgender Erythrozyten. Diese Hypothese kann die heterogene glomeruläre Albuminpermeabilität und ihr morphologisches Korrelat, die proximalen Resorptionsvakuolen erklären (72; 81).

Für die Beobachtung von Stefanidis (83; 84), dass in der Frühphase nach Transplantation eine hohe Proteinurie besteht, könnte folgende Erklärung gelten: die Spenderniere wird bei der Entnahme zellfrei perfundiert und konserviert. Damit werden glomeruläre Defekte demaskiert, die nach Transplantation im Empfänger zeitabhängig wieder maskiert werden mit Abdichtungsmaterial, das aus dem Vollblut des Empfängers stammt. Dies ist eine andere Interpretation als die von Stefanidis angebotene, der davon ausgeht, dass es durch die Konservierung zu Verlusten von Proteoglykanen in der glomerulären Barriere kommt, die dann wieder aufgebaut werden. Die Interpretation von Stefanidis erklärt nicht die Heterogenität, wie sie durch die Mikropunktionsanalysen zu Tage trat (18; 77; 81; 88) und wie sie durch Angiotensin II Einwirkung auch in vivo induziert werden kann.

1.3. Zunahme der Permeabilität für Protein in der Übergangsphase in vivo - ex vivo. Darstellung bisher vorliegenden Befunde

Um die Kinetik der Zunahme der Proteinurie nach dem Wechsel zur ex vivo Perfusion zu erfassen war es notwendig, noch in der in vivo Phase die Diurese mit Mannit ausreichend zu erhöhen, die ersten Urinproben nach wenigen Minuten zu gewinnen und in kurzen Zeitintervallen die Protein- bzw.

Albuminausscheidung zu erfassen. Die folgende Abbildung soll ein graphisches Bild der zugrundeliegenden Befunde geben und basiert auf den Ergebnissen der Dissertationsarbeit von Horst Pagel, die im Labor der Experimentellen Nephrologie der Medizinischen Hochschule in Hannover entstanden ist (55; 56).

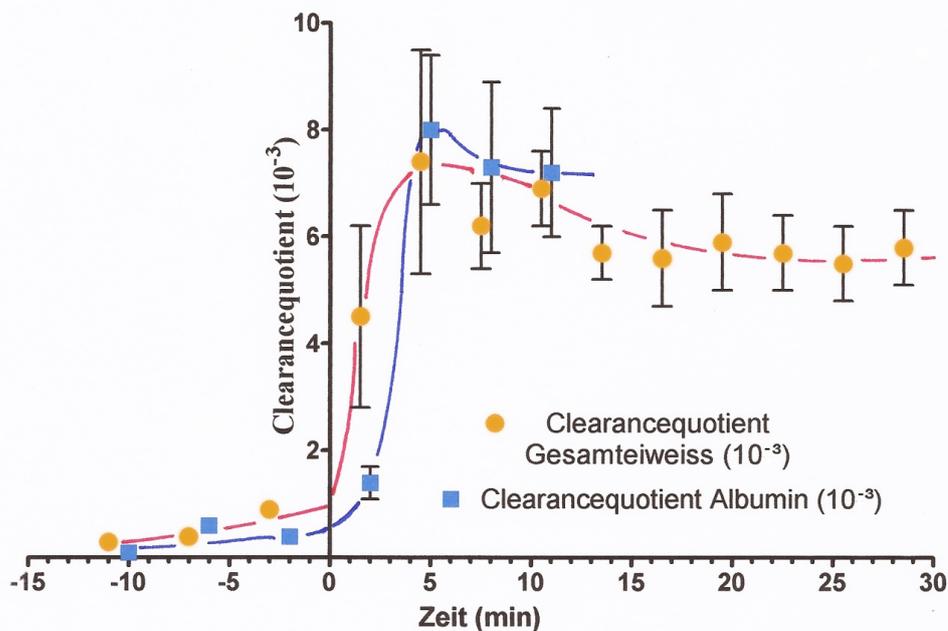


Abb. 1.1.: Der Clearancequotient für Albumin in der Übergangsphase in vivo - ex vivo. Bei 0 min ist die Übergangsfunktion von in vivo zu ex vivo dargestellt als Clearancequotient für Protein bzw. Albumin (im Perfusat 5 g%), links außen bei -10 min sind die Clearancequotienten aufgetragen die tags zuvor im Stoffwechselkäfig in vivo erhoben wurden, daneben die Daten aus der Narkosephase. Kurz vor der Übergangsphase wurde das Urinvolumen durch Mannitolgabe erhöht, um die frühe Übergangsphase besser erfassen zu können.

In der frühen ex vivo Phase ist der Clearancequotient für Gesamteiweiß höher als für Albumin (Auswaschphase), nach 10 min gleicht er sich an, weil dann nur noch Albumin als Protein im Perfusat angeboten wird. Danach wurde nicht mehr differenziert und nur noch Gesamteiweiß gemessen. Die Abbildung ist modifiziert nach Pagel (55; 56). Bezugspunkt des Clearancequotienten war die GFR als Inulinclearance.

1.4. Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere

Die glomeruläre Kapillarwand in der Niere zeigt im Vergleich zu anderen Gewebskapillaren eine besondere Eigenschaft. Das sind eine sehr hohe Wasserpermeabilität und eine sehr niedrige Durchlässigkeit für Serumeiweiße. Durch die glomerulären Kapillaren werden in den Nieren des Menschen pro Minute ca. 120 ml Plasmawasser abfiltriert. Dieses Ultrafiltrat enthält alle Plasmabestandteile mit einem Molekulargewicht von weniger als 5-10 kD. Die geringe Menge an dennoch filtriertem Albumin (70; 81; 88) und niedermolekularen Proteinen und Peptiden werden im proximalen Tubulus zum größten Teil resorbiert, somit werden im Endurin nur Spuren von niedermolekularen Proteinen, Peptiden und etwa 20 bis 40 mg Albumin pro die gefunden. Dagegen werden die hochmolekularen Proteine unter physiologischen Bedingungen praktisch nicht glomerulär filtriert.

Die im Endurin nachweisbaren hochmolekularen Proteine werden von distalen Tubulussegmenten abgegeben, wie das Tamm-Horsfall Protein und sekretorisches IgA (26; 81). Die im Glomerulus abfiltrierte Flüssigkeit muss eine aus drei Schichten bestehende Membran passieren: das Endothel, die Basalmembran und die Schlitzporen der Podozyten. Die Basalmembran wiederum besteht aus drei Zonen, beschrieben nach dem Bild wie sie sich elektronenmikroskopisch darstellen: der Lamina rara interna, der Lamina densa und der Lamina rara externa (60). Das mit dem Blut im Kontakt stehende Endothel weist Fenster mit mittleren Porendurchmessern von 50-100 nm auf. In der Embryonalentwicklung haben die Endothelfenster noch ein Diaphragma, das später verlorenght und was der hydraulischen Leitfähigkeit zugutekommt (38; 44).

Haraldsson hat Hinweise dafür gegeben, dass die Endothelfenster mit einer Art Schleimfilm austapeziert sind und die damit eine erste Barriere darstellen sollen. Dies ist ausführlich in einer Übersichtsarbeit beschrieben (28). Das Endothel liegt der Basalmembran auf. Die Größenselektivität der filtrierten Moleküle (weniger als 10 nm) wird durch das Kollagengerüst der

Basalmembran, besonders ihrer mittleren Schicht, der Lamina densa (Kollagen Typ IV) mitbestimmt. Die Basalmembran bildet zusammen mit den Schlitzporen der Podozyten die Endstrecke der Barriere. Die Struktur der Schlitzporen zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten ist heute durch eine Reihe von Arbeiten von Tryggvason weit besser bekannt einschließlich von neu entdeckten Strukturproteinen wie dem Nephrin (93; 94). Eine Übersicht findet sich bei Pavenstädt, Kriz und Kretzler (57). Die Schlitzporen der Podozyten sind mit Sialoproteinen versehen und liegen der Basalmembran fest an. Durch diese Anordnung ist der effektive Porenradius auf ca. 1,5-4,5 nm begrenzt.

Eine besondere Bedeutung kommt negativen Festladungen der glomerulären Kapillarwand zu, die in morphologischen, histochemischen und physiologischen Arbeiten beschrieben worden sind. Eine frühe Übersicht wurde von der Arbeitsgruppe von Brenner 1976 gegeben (14). Mit mono- oder polykationischen Farbstoffen sind diese Festladungen gut beschrieben worden, zuletzt auch in Ihrer Feinstruktur von Reale, Luciano und Kühn (60).

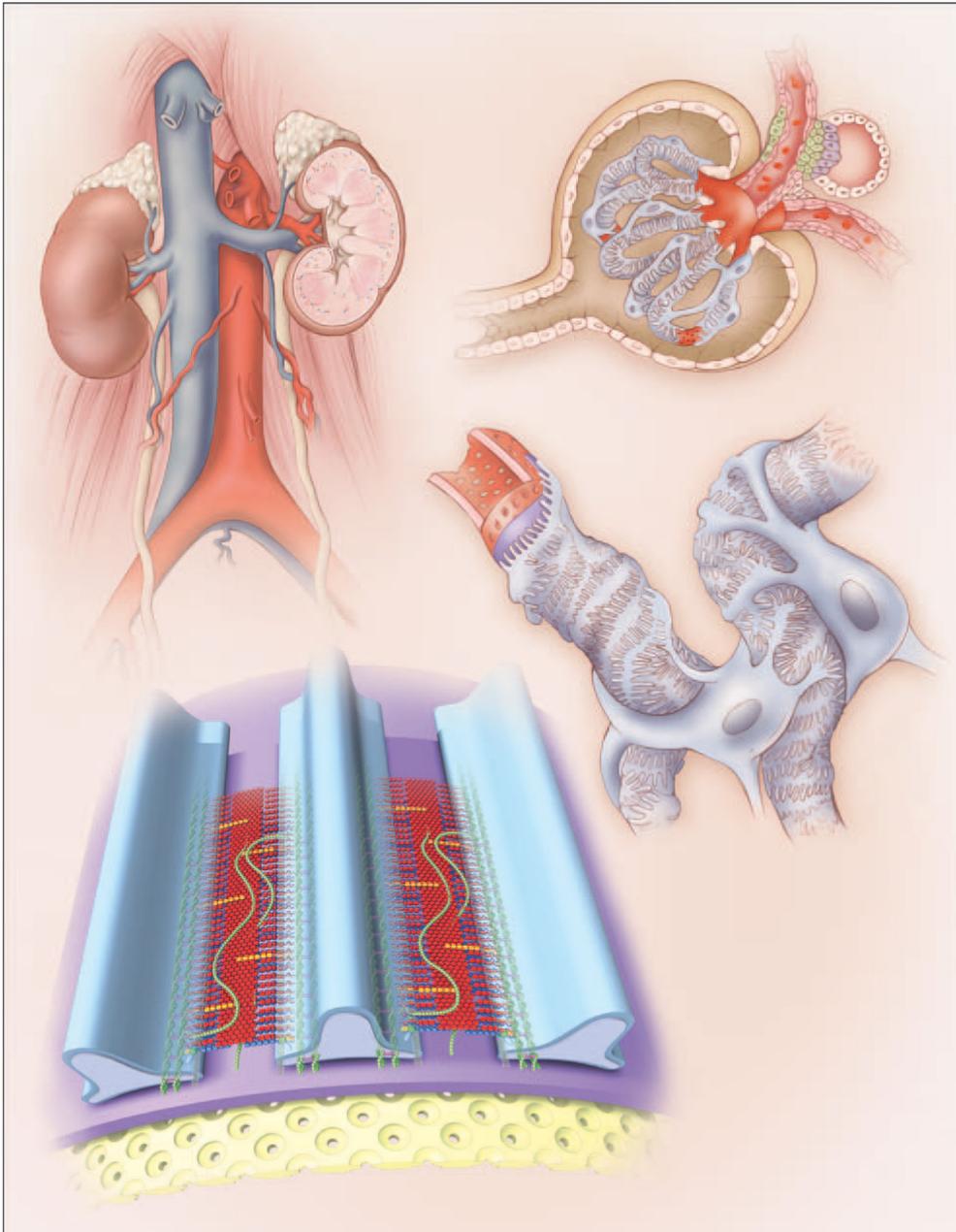


Abb. 1.2.: Glomeruläres Filtrationssystem in der Übersicht nach Tryggvason (94). Dargestellt sind beide Nieren, daneben eines von 1 Million Glomeruli (pro Humaniere), darunter eine Einzelkapillare mit Podozyten als Stützgerüst und der eigentlichen Filtrationsbarriere mit fenestriertem Endothel, Basalmembran und Filtrationsschlitz, s.a. folgende Abbildungen.

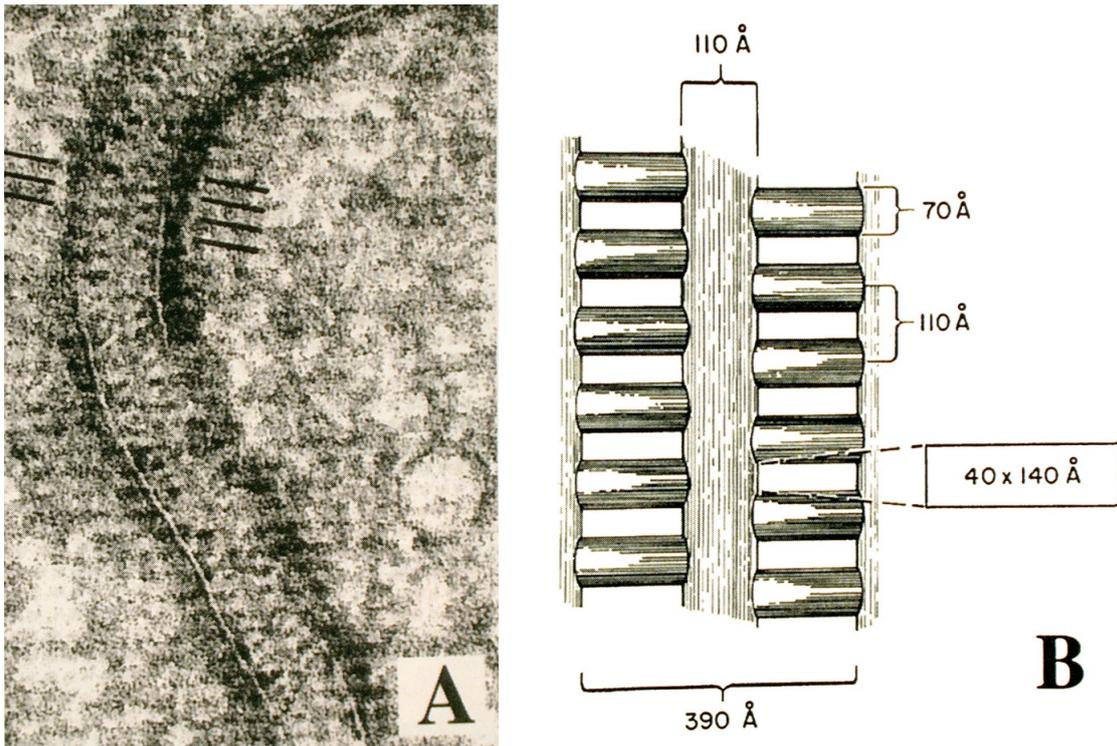


Abb. 1.3.: Erste Darstellung der Schlitzmembran mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durch Rodewald und Karnovsky mit schematischer Darstellung der Größenverhältnisse (63). 10 Å (Ångström) entsprechen einem nm.

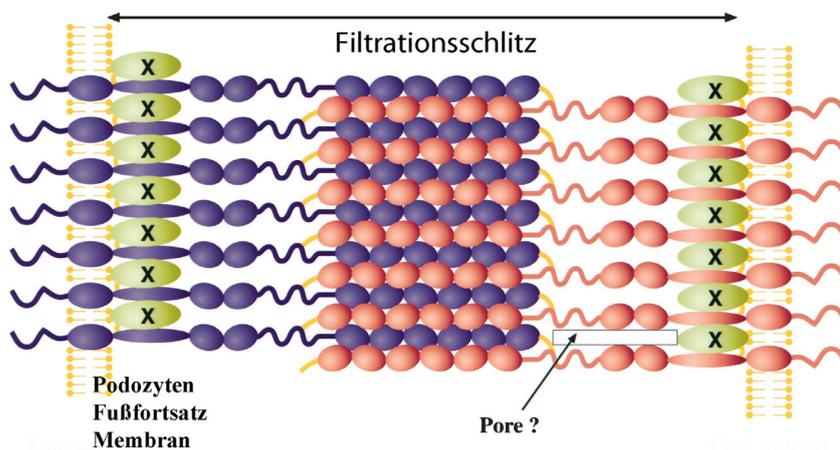


Abb. 1.4.: Erste schematische Darstellung der Schlitzmembran nach der Entdeckung von Nephrin, dem zentralen Strukturprotein der Schlitzmembran (93). Das als Pore mit Pfeil markierte Rechteck entspricht dem Weg, den das wässrige Ultrafiltrat bei Passage des Filtrationsschlitzes nimmt.

1.5. Glomeruläre Proteinpermeabilität in vivo

Für die Permeabilität eines Proteinmakromoleküls spielen nicht nur sein Radius und seine Form, sondern auch die Art und Anzahl seiner Festladungen eine entscheidende Rolle. Negativ geladene Makromoleküle werden weitaus mehr an der Durchgängigkeit gehindert als neutrale und kationische Makromoleküle, weil alle drei oben genannten Filtrationsbarrieren negative Festladungen tragen. Das Albumin und andere Serumeiweißmoleküle werden durch ihre negative Oberflächenladung bei physiologischem pH nicht nur gut in Lösung gehalten, sondern von negativen Ladungen der Filtrationsbarriere auch abgestoßen (14; 25; 81).

Einen großen Einfluss auf die Proteinpermeabilität hat die Hämodynamik (67). Die hämodynamischen Veränderungen mit Druckerhöhung in den Glomeruluskapillaren können die Durchlässigkeit der Barriere für Makromoleküle erhöhen. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass es unter der Wirkung von Angiotensin II zu einer deutlich erhöhten Albuminpermeabilität kam (18). Zugleich fand sich eine erhöhte Durchlässigkeit für Moleküle mit etwas größeren Molekulargewichten. Die Wasserpermeabilität nahm dabei jedoch ab. Ursächlich sind hier eine Mesangiumzellkontraktion und/oder Veränderung der Größe der Schlitzporen zwischen den epithelialen Fußfortsätzen sowie eine Konstriktion der efferenten Arteriole anzunehmen. Erst kürzlich sind die Befunde zur Albuminpermeabilität auch unter Angiotensin II mit neuer Technologie eindrucksvoll bestätigt worden (70).

Ein Überschuss an Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin) kann ebenfalls die Durchlässigkeit der Barriere für Makromoleküle erhöhen, was z.B. bei Patienten mit Herzinsuffizienz bekannt ist (15; 23). Zudem wurden Unterschiede in der glomerulären Permeabilität für Makromoleküle zwischen subcorticalen und juxtamedullären Glomeruli am Ratten-Modell der spontanen Hypertonie festgestellt (22). Der wahrscheinlichste Grund für die höhere Durchlässigkeit der Glomeruli innerer Rindenschichten ist die kürzere vorgeschaltete Strecke der Interlobulararterie, wodurch diese weniger vor Hochdruckfolgen geschützt sind als kapselnahe Glomeruli. An juxtamedullären Glomeruli finden sich auch

die ersten Veränderungen im Sinne einer Glomerulosklerose (22). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass nach einseitiger Nephrektomie eine kleine, aber signifikante Zunahme der glomerulär filtrierte Plasmaproteine im Endurin des betroffenen Menschen gefunden wird (53; 77; 88).

Unter pathologischen Bedingungen im Rahmen von Glomerulonephritiden kann es zu einer deutlichen Erhöhung der Permeabilität für Plasmaproteine kommen. Die Hauptstörung bei der sogenannten glomerulären Minimalläsion liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in der Rarefizierung des negativen Ladungsgitters mit einer zusätzlichen Reduktion der Porendichte. Größere Serumeiweißmoleküle werden durch die noch intakte Lamina densa der Basalmembran weitgehend zurückgehalten, so dass eine selektive Zunahme der Albuminpermeabilität und als Folge eine im Endurin dominierende Albuminurie (sogenannte selektive Proteinurie) entsteht (77; 88).

1.6. Besonderheiten der glomerulären Proteinpermeabilität ex vivo

Mit unterschiedlichen experimentellen Techniken wurden an der isolierten Rattenniere alle wichtigen Haupteigenschaften des glomerulären Filters, wie Ladungs- und Größenselektivität, unter anderem auch bei hämodynamischer Störung untersucht (77; 81). Durch den Einsatz von polykationischen Substanzen konnte gezeigt werden, dass es durch Neutralisation der ortsständigen Membranladungen zu einer erhöhten Albuminpermeabilität kommt (2), die in vivo durch Abbau der Polykationen nur passager nachweisbar ist. Am Modell der isolierten Niere ließ sich feststellen, dass sich bei dem schrittweisen Neutralisieren des Ladungsgitters ein dosisabhängiger Anstieg der Albuminpermeabilität zeigt. Bei intakter Podozytengeometrie kommt es dabei nicht zu einer Veränderung der Größenselektivität des glomerulären Filters gegenüber neutralen Makromolekülen (16; 77; 81; 88).

Untersuchungen an der isolierten Niere auf ihre Proteinpermeabilität (Clearance- und Mikropunktionsuntersuchungen) haben eine Heterogenität der Glomeruli in Hinblick auf ihre Größenselektivität gezeigt, die in vivo so nicht nachweisbar ist (18; 81; 91). Bei zellfreier Perfusion mit Albumin als alleinigem

Protein zeigte sich eine um den Faktor 10-20 deutlich höhere Albuminurie als in vivo. Aus der schiefen Häufigkeitsverteilung der Analysen von frühproximalen Mikropunktionsproben mit einem Gipfel im normalen Bereich (bis 4 mg/dl) und 16% hohen Einzelwerten von über 30 mg/dl lässt sich schließen, dass unter physiologischen Bedingungen größere Lücken im Kollagennetz der Lamina densa (Membrandefekte) bestehen. Diese Defekte werden nach der diskutierten Hypothese in vivo durch Komponenten aus dem Vollblut abgedichtet. Unter zellfreier Perfusion kommt es zur Freilegung der sonst maskierten Defekte, was einen Anstieg der Albuminurie zur Folge hat. Diese Defekte sind offensichtlich auch für die normale Erythrozytenausscheidung verantwortlich, wenn die Defektgröße für die Erythrozytenpassage (>200 nm) ausreichend ist (39). In der Natur dürfte die Zahl der Defekte wahrscheinlich gering sein und nur für einen kurzen Moment freigegeben werden, sonst hätte man das alpha-2-Makroglobulin, sonst ein typischer Marker für ein extraglomeruläres/extrarenales Geschehen, im Endurin eines gesunden Menschen nachweisen können (26; 34; 35). Unter Zusatz von 5% Erythrozyten bei der in vitro Perfusion konnte eine signifikante (Faktor 2-3) Reduktion der Albuminpermeabilität erreicht werden (56; 89). Ein höherer Anteil an roten Blutkörperchen konnte die Proteinurie nicht weiter verringern. Es wird daher eine zweite Gruppe von Defekten kleinerer Dimension geben, die durch Erythrozyten nicht abgedichtet werden können, diese tragen jedoch zur höheren Albuminpermeabilität in vitro auf Grund deren Demaskierung bei (72; 77; 81). Unter hämodynamischer Belastung, das heißt unter dem Einfluss von Angiotensin II, wurde in vitro zwar sein vasokonstriktorisches Effekt, aber keine Auswirkung auf die Proteinurie wie unter in vivo Bedingungen gefunden. Hieraus wurde geschlossen, dass unter Perfusion bereits demaskierte Defekte durch eine hämodynamische Störung nicht weiter beeinflusst werden können (81; 91).

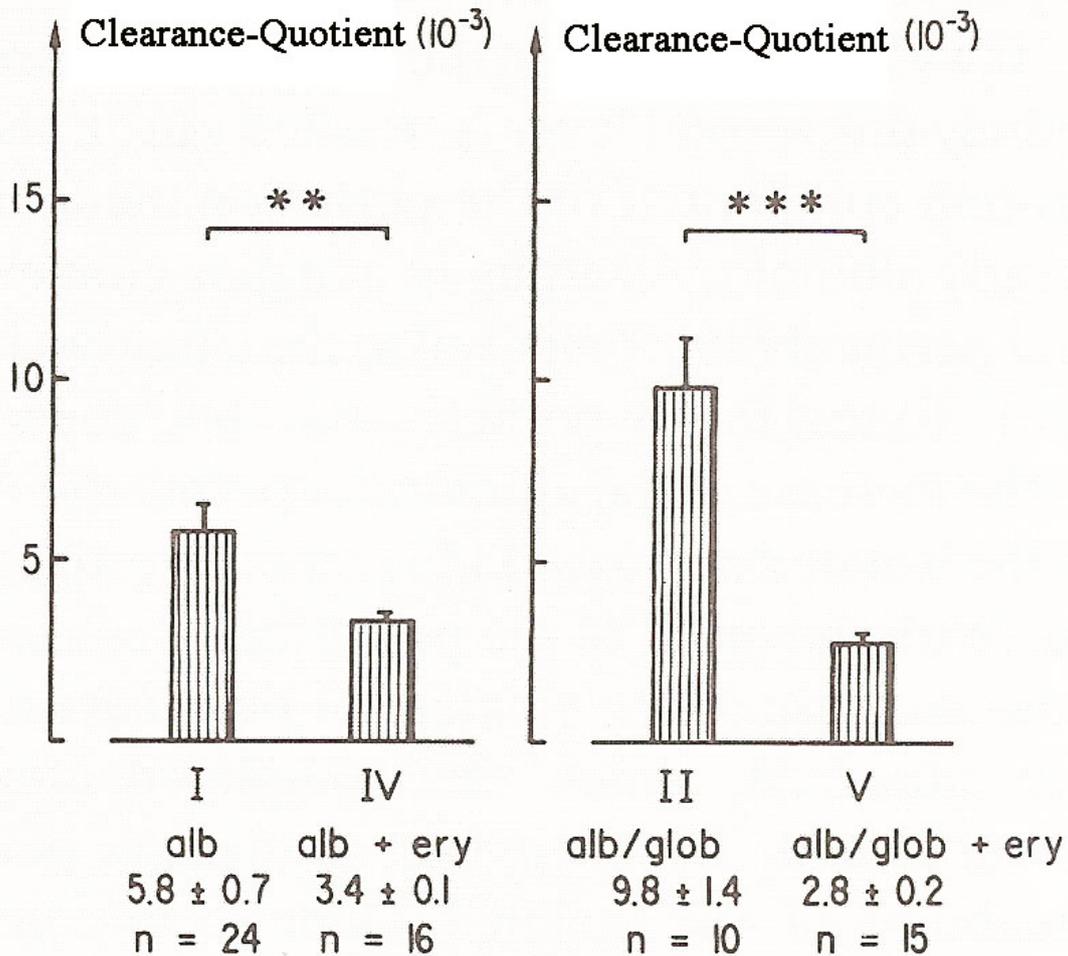


Abb. 1.5.: Einfluss von Erythrozyten auf die Albuminpermeabilität an der IPRK. Links ist der Effekt der Erythrozytenzugabe (+ ery) auf den Clearance-Quotienten für Albumin (alb) dargestellt. Noch deutlicher ist der Effekt wenn 4g% Albumin mit 1g% eines größeren Eiweißkörpers wie hier Globulin (glob) kombiniert wurde. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Darstellung ist einer Arbeit von Pagel und Stolte entnommen (55; 56). Dies bestätigt Befunde von Swanson (89).

Die sogenannte funktionelle Proteinurie wie die orthostatische Proteinurie oder die Proteinurie unter Belastung (Einfluss von Katecholaminen, Fieber, Hypertonie oder nach einseitiger Nephrektomie), ist eine unselektive Proteinurie, also mit Nachweis von verschiedenen Proteinarten und

Proteingrößen (11). Diese Proteinurie könnte am ehesten dadurch erklärt werden, dass unter natürlichen Bedingungen maskierte Defekte der glomerulären Barriere unter hämodynamischen Veränderungen passager demaskiert werden (18; 77; 91; 101). Dies entspricht der Renin-induzierten Proteinurie, die experimentell durch Angiotensin-II-Infusion erzeugt wurde und reversibel ist (18; 101) und durch ACE-Hemmer (71) bzw. Rezeptor-Antagonisten blockiert werden kann.

1.7. Fragestellung der Arbeit: Analyse der Dynamik der Mikrohämaturie bei zellfreier Perfusion und bei Zusatz von Erythrozyten

Ziel der Arbeit war es, die experimentelle Grundlage der diskutierten Hypothese insoweit zu verbreitern, als eine quantitativ ausreichende Analyse der Ausscheidung roter Blutzellen bisher fehlte. Dagegen war die Analyse einer erhöhten Proteinurie bereits ausreichend belegt (55; 56; 72; 73; 76; 77; 81; 88; 89). Bei der zellfreien Perfusion der isolierten Rattenniere fand sich, außer einer deutlichen Zunahme der glomerulären Permeabilität für Albumin gemessen an der deutlich erhöhten Albumin Ausscheidung, eine bis zu 60 min anhaltende Ausscheidung roter Blutzellen. Diese mutmaßlich exponentielle Abnahme sollte durch weitere Experimente belegt werden. Parallel zu der abnehmenden Mikrohämaturie zeigte sich konsekutiv eine zunehmende Proteinurie. Ob dieses mit der abnehmenden Mikrohämaturie zusammenhängt war unklar. Denkbar war, dass die ausgeschiedenen Erythrozyten, die möglicherweise zur Abdichtung der physiologischen Membrandefekte beigetragen hatten mit Ihrer Ausscheidung bisher abgedichtete Membranlücken demaskieren und für die Albuminpassage öffnen. Dies könnte erklären, dass nach dem Zusatz von 5-10% Erythrozyten zum Perfusat rote Blutzellen in größere Defekte eindringen und diese passager abdichten und damit die erhöhte Albuminpermeabilität deutlich reduziert haben. Nach Passage durch die Lücke und Eintritt eines Nachfolgeerythrozyten kommt es zu einer über die Versuchsdauer persistierenden Mikrohämaturie (72; 77; 81; 88). Die von Erythrozyten nicht tangierten kleineren Defekte wären dadurch erklärt, dass weiteres

Abdichtungsmaterial wie Gerinnungsfaktoren, Makromoleküle, Kittsubstanzen, Thrombozyten und andere zelluläre Elemente im Perfusat fehlen, weswegen diese Defekte demaskiert bleiben, die unter in vivo Bedingungen dagegen abgedichtet sind. An der isolierten Hundeniere haben Masri et al. Hinweise dafür gefunden, dass auch Fibrinogen eine Rolle hierbei spielen kann (50) .

1.8. Klinische Korrelate zu den experimentellen Befunden

Sowohl unter physiologischen Bedingungen (z.B. sportliche Belastung) auf Grund des Zusammenspiels mehrerer Hormone mit konsekutivem Einfluss auf die glomeruläre Hämodynamik sowie Filtrationsdynamik, als auch bei komplexen Formen glomerulärer Entzündungsreaktionen mit fokalen hämodynamischen Störungen oder Ausbildung von Membrandefekten kann es zur Erhöhung der glomerulären Proteinpermeabilität, und sogar - bedingt durch größere Membrandefekte – zu einer Mikro- oder Makrohämaturie (12) kommen. Fasset in Australien hat eine Gruppe von 48 Langstreckenläufer vor und nach der Belastung untersucht (21) und fand dabei nicht nur eine Zunahme der Proteinurie (6 von 48 hatten eine Spur Urineiweiß vor dem Lauf) sondern auch eine ausgeprägte Zunahme der Mikrohämaturie mit eindeutig glomerulärer Dysmorphie. Abbildung 1.6 ist modifiziert dieser Publikation entnommen.

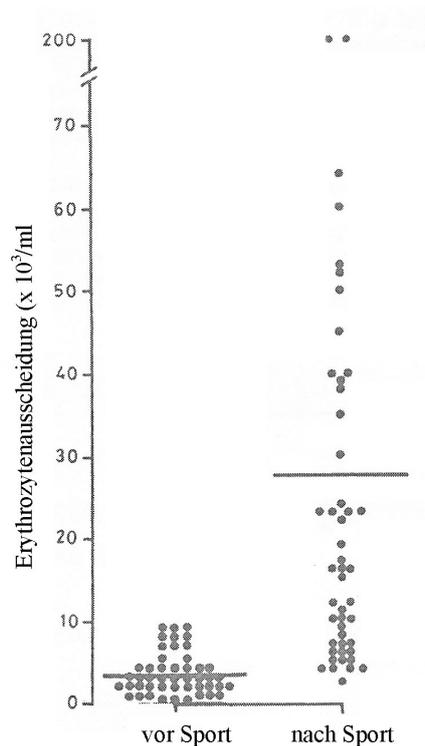


Abb. 1.6.: Hämaturie vor und nach Belastung. Die Läufer legten 9 km [41] und 14 km [7] zurück. Vor Belastung zeigte das Kollektiv weniger als 10.000 Erythrozyten/ml Urin, 44 Läufer sogar weniger als 8.000/ml. Nach dem Lauf hatten 33 Läufer mehr als 8.000 Erys/ml, und 19 hatten mehr als 20.000 Erys/ml, bei 7 fanden sich mehr als 50.000 Erys/ml. Die mit einem Teststreifen ermittelte Proteinurie nahm im Mittel ebenfalls deutlich zu. Vor dem Lauf hatten 6 eine Spur Eiweiß im Urin, nach dem Lauf waren 18 positiv im Urineiweißtest (+ und ++). Weitere Details s. Originalpublikation (21).

1.8.1 Proteinurie

Als Beispiel für eine funktionelle Proteinurie kann die orthostatische Proteinurie gelten. Diese meist gutartige Veränderung findet man bei 3–5% der Adoleszenten und jungen Erwachsenen. Charakteristisch ist eine erhöhte Proteinausscheidung im Urin bei aufrechter Körperhaltung, die beim Liegen verschwindet. Als Erklärung dieses Phänomens wird die orthostatische

Kompression der Vena cava oberhalb der Nierenvenen oder Kompression der Nierenvenen durch Hyperlordose der Wirbelsäule angenommen. Der kompressionsbedingte erhöhte Venendruck führt zur vermehrten glomerulären Proteindurchlässigkeit, was auch in vitro am Modell der isolierten Rattenniere (88), aber auch in vivo am experimentellen Modell durch lokale Angiotensinwirkung (101) gezeigt werden konnte. Entsprechende klinische Untersuchungen bei betroffenen Patienten (Analyse des 12h-Tagesurins) zeigten verschiedene Proteinfractionen mit deutlichem Anstieg des Albumins im Vergleich mit dem 12h-Nachturin. Somit handelt es sich bei dieser Art der Proteinurie um eine funktionelle und „unselektive“ Proteinurie (34; 71; 77). Diese Form der Proteinurie kann auch unter dem Einfluss von Fieber (11; 31), bei Herzinsuffizienz (15; 23) oder passager bei Zustand nach einseitiger Nephrektomie (53) auftreten. Als Grund dafür wird einerseits der erhöhte glomeruläre Kapillardruck und andererseits eine passagere Demaskierung der physiologischen Membrandefekte unter hämodynamischen Veränderungen angenommen (61; 71; 77; 91; 101). Angiotensin II dürfte auch hier eine Rolle spielen.

Verschiedene Formen der Glomerulopathie können mit Veränderungen in der Ladung und/oder der molekularen Struktur der Basalmembran einhergehen. Das dadurch geänderte „Siebverhalten“ hinsichtlich Größen- und Ladungsselektivität führt konsekutiv zur erhöhten Proteinausscheidung (28). Reine Albuminurien (selektive Proteinurie) mit Verlust der Ladungsselektivität findet man unter anderem bei einer Minimal-Change-Glomerulopathie, bei frühen Formen der Immunkomplex-Nephritis und im Frühstadium der diabetischen Nephropathie, bei Letzterer wird auch eine reduzierte tubuläre Resorption diskutiert (66). Bei struktureller Änderung der Basalmembran entsteht eine unselektive Proteinurie mit Nachweis von Albumin in Kombination mit höhermolekularen Proteinen. Ursächlich dafür sind häufig Immunkomplexablagerungen, proliferative Umbauvorgänge, Halbmondbildungen der Bowman-Kapsel und progrediente Nephrosklerosen (8; 26; 34; 43). Je nach Ausmaß der Membrandefekte kann dabei auch eine begleitende Hämaturie entstehen.

1.8.2 Hämaturie

Die Hämaturie (Mikrohämaturie) ist häufig als Hauptsymptom der verschiedenen Nierenerkrankungen entweder in Folge einer Entzündungsreaktion oder Veränderung der Basalmembran wie bei Alport-Syndrom oder einer Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran anzusehen. Als andere Ursachen der Hämaturie können verschiedene Gerinnungsstörungen oder die Wirkung diverser Antikoagulantien in Betracht kommen. In den folgenden Abschnitten werden alle oben genannten Ursachen der Hämaturie detailliert angesprochen.

Als Mikrohämaturie wird die Ausscheidung makroskopisch nicht wahrnehmbarer Erythrozyten bezeichnet, welche im Urin durch mikroskopische Untersuchung oder mittels Teststreifen bestimmt wird. Es finden sich unterschiedliche Grenzwerte für Kinder und Erwachsene. Wenn bei Kindern noch eine Erythrozyten Ausscheidung bis 5 pro genormtem Gesichtsfeld (400-fache Vergrößerung) toleriert wird, wird bei Erwachsenen das Vorliegen von 2–3 Erythrozyten pro Gesichtsfeld als pathologisch bewertet (4; 8; 98). Hintergrund für den Unterschied zwischen Kindern und Erwachsenen ist folgendes: die Dicke der glomerulären Basalmembran nimmt altersabhängig deutlich zu und ist im Kindesalter am dünnsten. Je nach Entstehungsquelle kann eine Hämaturie renale (glomeruläre und postglomeruläre) oder postrenale Ursachen haben. Eine renale oder besser renoparenchymatöse Ursache für die Hämaturie findet sich maximal in 3,5% der Fälle (4). Einige Autoren beschrieben einen höheren Anteil von 6% als renoparenchymatöse Ursache der Hämaturie (40).

Häufige Ursachen der renalen Hämaturie sind die IgA-Nephropathie, die fokalsegmentale Glomerulonephritis, die Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran, aber auch zystische (zum Beispiel die Zystennieren) und vaskuläre Missbildungen, Papillennekrose oder Tumor. Erkrankungen der ableitenden Harnwege wie Steinerkrankung, Prostataadenom, entzündliche Erkrankungen des Harntraktes (Zystitis, Urethritis, Prostatitis) oder

Urotheltumore stellen wie der Name sagt die Ursachen der postrenalen Hämaturie dar (49).

Einen wichtigen Hinweis zur Einordnung der Hämaturie kann die mikroskopische Untersuchung des Urinsedimentes liefern, am besten mit der Phasenkontrast-Mikroskopie. Der Nachweis von dysmorphen Erythrozyten insbesondere mit Ausstülpungen der Zellwand (sogenannte Akanthozyten), Halbmondformen und weitere Zelldeformierungen spricht eher für eine glomeruläre Ursache (9; 10; 19; 20). Von entscheidender Bedeutung ist die hohe Spezifität der Akanthozyturie, die wesentlich höher ist als der Nachweis von Erythrozyten-Zylindern. Das Vorkommen von 5% Akanthozyten weist bei einer bekannten Hämaturie mit einer Sensitivität von 50-85% bei hoher Spezifität von 98% auf eine glomeruläre Nierenerkrankung hin. Andererseits schließt das Fehlen einer Akanthozyturie eine glomeruläre Erkrankung nicht aus. Dabei ist darauf zu achten, dass bei verstärkter Diurese (zum Beispiel in Folge einer Diuretika-Therapie) der Anteil dysmorpher Erythrozyten deutlich vermindert wird (32; 49; 97). Demgegenüber finden sich nach Birch und Fairley (9) bei postrenalen Hämaturien gewöhnlich nur zwei Formen von Erythrozyten, unbeschädigte Zellen mit normalem Hb-Gehalt und Geisterzellen („ghosts“), die ihr Hämoglobin verloren haben.

Zur Differenzierung einer renalen von einer postrenalen Hämaturie kann auch die Bestimmung des Proteinuriemusters beitragen. Bei der postrenalen Hämaturie werden hochmolekulare Proteine in höheren Konzentrationen ausgeschieden, die in ihrem Verhältnis zu niedermolekularen Proteinen mit dem des Plasmas vergleichbar sind. Der Nachweis von alpha-2-Makroglobulin, eines hochmolekularen Proteins, welches sogar durch den erkrankten Glomerulus nicht filtriert wird, hat sich ebenfalls zur Diagnostik der postrenalen Hämaturie bewährt (26; 32).

Alport-Syndrom und Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran

Alport-Syndrom und Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran (GPvTddBM) sind Erkrankungen, die familiär gehäuft auftreten und durch strukturelle Anomalien der glomerulären Basalmembran gekennzeichnet sind.

Eine Hämaturie ist in beiden Fällen meistens als erstes Symptom der Erkrankung zu erkennen. Häufig findet sich dabei noch eine begleitende Proteinurie, bei Alport-Syndrom deutlicher als bei der GPvTddBM (27; 77).

Die GPvTddBM ist die häufigste Ursache der glomerulären Hämaturie sowohl im Kindes- als auch Erwachsenenalter, welche etwa 1% der Bevölkerung betrifft. Das Alport-Syndrom kommt mit 0,02 % vergleichsweise selten vor und wird hauptsächlich (85% der Fälle) x-chromosomal dominant vererbt. Bei diesem Erbgang findet sich eine Mutation (Gen COL4A5), welche Defekte der α -Kette des Typ-IV-Kollagens bewirkt, das in den Basalmembranen der Niere und des Innenohres vorkommt. Circa 40 % der Patienten mit Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran sind heterozygote Träger des autosomal rezessiven Alport-Syndroms mit einer Mutation des Chromosom 2, Gene COL4A3/COL4A4 (27; 68; 92).

Die Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran hat insgesamt eine relativ gute Prognose. Dagegen können beim Alport-Syndrom schon im jungen Erwachsenenalter in etwa 50% beidseitige Innenohrschwerhörigkeit sowie in 10% der Fälle verschiedene Augenveränderungen (kegelförmige Vorwölbung der Augenlinse (Lenticonus anterior), Katarakt oder Retinaveränderungen) auftreten. Als Spätfolge der Erkrankung tritt eine chronisch progrediente Niereninsuffizienz auf. Eine definitive Diagnosesicherung ist nur durch die elektronenmikroskopische Untersuchung des Nierenbiopsates möglich (43).

Die dabei nachweisbaren morphologischen Unregelmäßigkeiten der Basalmembran führen offensichtlich zur vermehrten Durchlässigkeit der glomerulären Barriere mit konsekutiver Proteinurie sowie Hämaturie. Damit ist anzunehmen, dass die diskutierten intrinsischen Reparaturmechanismen nicht ausreichend in der Lage sind Defekte dieser Größenordnung der morphologisch veränderten Basalmembran abzudichten.

Antikoagulation

Aus dem klinischen Alltag ist bereits lange bekannt, dass alle auf dem Markt vorhandenen diversen Antikoagulantien (z.B. Cumarine wie Phenprocoumon (Marcumar) oder Warfarin, ASS und Clopidogrel oder verschiedene Heparine)

das Blutungsrisiko deutlich erhöhen. Unter Antikoagulationstherapie treten spontane oder traumabedingte Gewebseinblutungen und interstitielle Blutungen wie Magenschleimhautblutung oder Blutung im Harntrakt häufig auf. Die meisten Blutungen der Niere oder des Harntraktes zeigen sich in Form einer Hämaturie. Die Literatur zeigt, dass eine Makrohämaturie bei 4-24 % und Mikrohämaturie bei 40% der Patienten unter Antikoagulationstherapie nachweisbar ist. Die Inzidenz der Hämaturie bei Patienten unter Antikoagulantien wird mit 20-30% angegeben (95). Die vorliegenden Studien haben gezeigt, dass keine Korrelation sowohl zwischen dem Grad der Antikoagulation und dem Auftreten von Hämaturie als auch zwischen dem Grad der Hämaturie und dem Schweregrad der zumeist urologischen Erkrankung vorliegt (4; 17; 24; 95). Die meisten Ursachen einer Hämaturie auch unter Antikoagulantientherapie sind postrenal und fallen somit in das urologische Fachgebiet. Hierbei sind folgende Ursachen und deren Häufigkeit zu erwähnen: eine Harnwegsinfektion und als Folge eine Urethritis, Zystitis oder Prostatitis liegt bei 4–46%, die benigne Prostatahyperplasie (Prostatavariizen) bei 1–47%, eine Urolithiasis bei 3,6–15,5% oder maligne Tumoren bei 1–12,5%. Aus urologischer Sicht kann eine beim Patienten bestehende Antikoagulationstherapie nur positiv bewertet werden, weil durch das Signal Hämaturie eine frühzeitige Aufdeckung der schwerwiegenden und zum großen Teil (10-52%) behandlungsbedürftigen Erkrankungen möglich ist (4; 95).

Für die spezielle Fragestellung dieser Arbeit ist die renale Genese der Hämaturie interessant, die nur mit einem geringen Anteil von 3,5% vertreten ist. Davon ist der bedeutsame Teil durch inflammatorische Erkrankungen wie postinfektiöse Glomerulonephritis bei Kindern, sekundäre Glomerulonephritis (IgA-Nephropathie) oder fokal-segmentale Glomerulonephritis (FSGN) repräsentiert. Man kann annehmen, dass eine Hämaturie unter Antikoagulationstherapie auch bei sonst nierengesunden Menschen auftreten kann. Eine Erklärung dafür wäre eine vermehrte Durchlässigkeit der Basalmembran durch nicht ausreichende Abdichtung der Membrandefekte durch Gerinnungsfaktoren und zelluläre Elemente in Folge der Gerinnungshemmung.

Gerinnungsstörungen

Bei den Gerinnungsstörungen handelt es sich entweder um angeborene oder seltener um erworbene Erkrankungen, die entweder durch einen Mangel oder eine Funktionsstörung verschiedener Gerinnungsfaktoren der komplexen Gerinnungskaskade charakterisiert sind. Die bekanntesten Formen der Gerinnungsstörung sind unter dem klinischen Begriff „Hämophilie“ etabliert. Als klassische Vertreter sind dabei zwei Typen der Hämophilie zu erwähnen: Hämophilie A, die durch einen Mangel an Faktor VIII (antihämophiles Globulin) und Hämophilie B, durch einem Mangel am Faktor IX (Christmas-Faktor) der Gerinnungskaskade bedingt sind. Man unterscheidet noch weitere Krankheitsbilder, die unter dem Begriff „Hämophilie“ subsumiert werden: zum Beispiel die sogenannte Angiohämophilie oder von Willebrand-Jürgens-Syndrom, wobei ein Strukturdefekt oder ein Mangel des von-Willebrand-Faktors, eines Trägerproteins des Blutgerinnungsfaktors VIII vorliegt oder eine Parahämophilie, auch Owren-Syndrom, gekennzeichnet durch den Mangel an Faktor V. In der Literatur werden unter anderem auch seltene erworbene Gerinnungsstörungen beschrieben, wie die erworbene Hämophilie in Folge einer Aktivitätsverminderung des Faktors VIII durch Einwirkung eines Faktor VIII-Inhibitors (Autoantikörper). Eine ähnliche Pathogenese kann auch den Faktor V betreffen, durch sekundäre Entstehung eines Faktor V-Inhibitors (Anti-FV-Antikörper) kommt es zur einer deutlichen Aktivitätsminderung des Faktors V (nur 1-2% der Normalaktivität). Die beiden letztgenannten Gerinnungsstörungen finden sich überwiegend bei älteren Patienten (30; 37; 54).

Bei allen bekannten Formen der Hämophilie liegt häufig als Begleitsymptom eine asymptomatische Hämaturie vor. Bereits in Jahr 1974 wurde von Serneri et al. (82) eine interessante Arbeit über Hämophilie-Patienten mit Hämaturie veröffentlicht. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch Substitution geringer Mengen an Faktor VIII ohne nachweisbare Verbesserung der Gerinnungsstörung ein deutlicher hämostatischer Effekt mit signifikanter Rückbildung der zuvor nachweisbaren Hämaturie erreicht werden konnte. Die verabreichten geringen Faktor VIII-Dosen konnten die tatsächliche plasmatische Aktivität des Faktors VIII nicht wesentlich verändert haben. Das

Phänomen dieses Effektes der dauerhaften Hämaturiekorrektur liegt an der direkten Wirkung des antihämophilen Globulins (Faktor VIII) auf die Kapillarwand (mit dauerhaft ist ein Zeitraum von einer Woche gemeint). Durch direkte Immunfluoreszenz konnte Faktor VIII im Tierexperiment in der Kapillarwand nachgewiesen werden. Durch Anwendung von Anti-Faktor VIII-Antiserum wurde eine Verminderung des plasmatischen Faktors VIII unter 5% mit anschließender Steigerung der Kapillarpermeabilität für nuklidmarkiertes Albumin sowie das Auftreten von Blutungen innerhalb der nächsten 48-60 Stunden beobachtet. Die Verzögerung zwischen der Abnahme der plasmatischen Faktor VIII-Aktivität und der Entstehung einer Blutung bedeutet, dass eher die Veränderungen der Gefäßwand durch Erschöpfung des Faktors VIII und nicht der Gerinnungsdefekt selber dafür verantwortlich ist (82). Der Nachweis einer signifikanten Wirkung des Gerinnungsfaktors VIII auf die Permeabilität der Kapillarwand unterstützt die Hypothese der physiologischen Defekte der glomerulären Kapillarwand, welche durch verschiedene Blutkomponenten, wie zelluläre Elemente, Serumproteine, Makromoleküle und schließlich die Gerinnungsfaktoren abgedichtet werden.

2. Experimentelle Methodik

2.1 Versuchstiere und Präparationstechnik zur Isolierung der Nieren

Die Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen gestattet und befanden sich im Einklang mit dem Tierschutzgesetz (Tierversuchsnummern: A 60/1993 und A67/09).

Versuchstiere:

Für alle Versuche wurden männliche Hannover-Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-350 g verwendet. Bei der Unterbringung in einem barrieregeschützten Raum waren sie serumpathogenfrei. Die Ratten wurden zu zweit in Polycarbonkäfigen gehalten und mit einer Altromin Standarddiät (Ratten und Mäuse) gefüttert. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Leitungswasser bis zum Tag des Experimentes. Die Betäubung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Applikation einer Mischung aus Xylazin (2%) und Ketamin (10%) in Proportion 1:40 oder durch Inactin (100mg/kg KG). Zur Perfusion wurde immer die rechte Niere verwendet. Die linke dekapsulierte Niere wurde als Gewichtgrundlage für die Berechnung der Funktionsparameter auf 1g Niere verwendet.

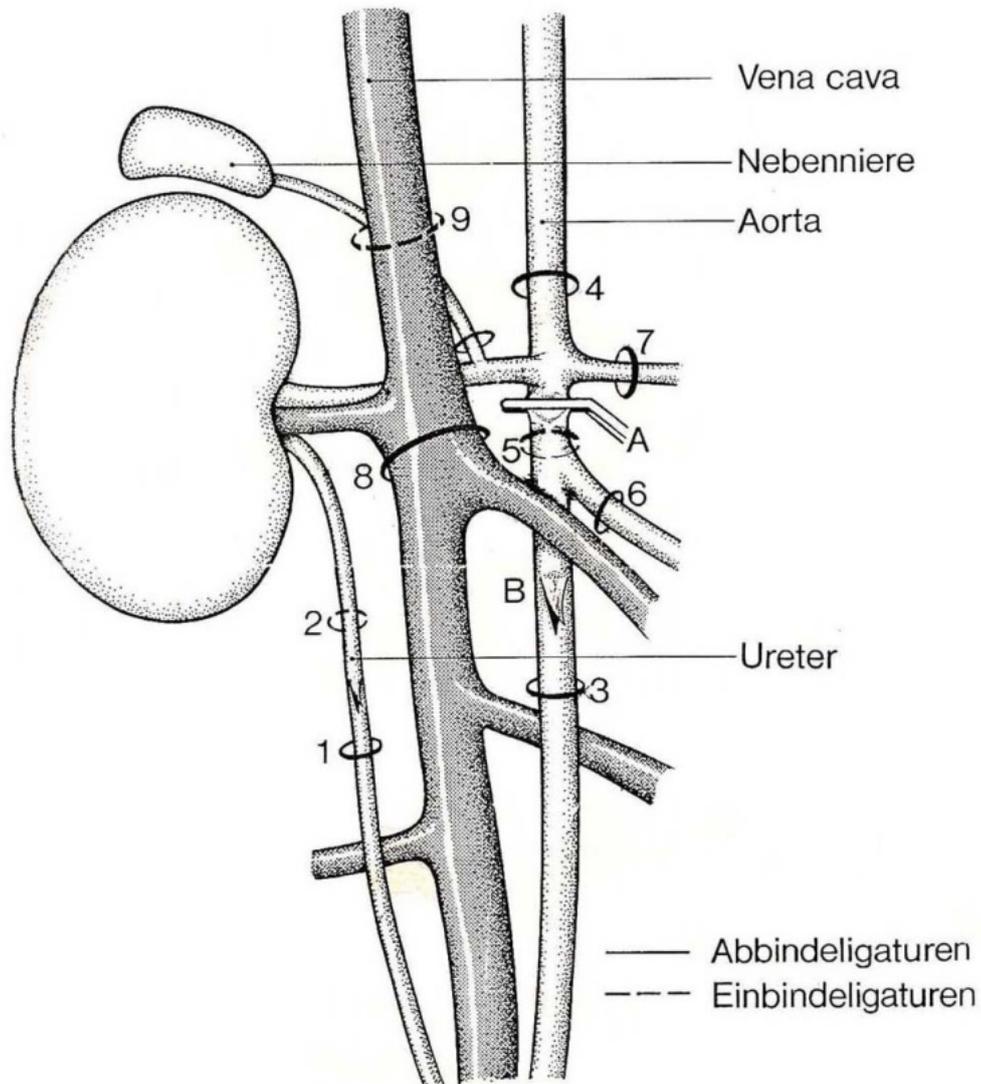


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung des Situs zur Präparation der rechten Niere (IPRK). Die Ligaturen und Inzisionen zur Kanülierung von Ureter und Aorta, modifiziert nach Weiss et al. (96) und Ross (51; 64). Die Nebennierenarterie entspringt meist der Nierenarterie und wird dort abgebunden. Der Ureter wird zwischen [1] und [2] katheterisiert ohne in das Nierenbecken vorzudringen. Die Ziffern 2, 5 und 9 (punktirt) sind Einbindeligaturen für Ureter, Aorta [5] und Vena cava [9]. Die Ziffern 1, 3, 4, 6, 7 und 8 (durchgezeichnet) sind Abbindeligaturen.

Präparation der rechten Niere:

Die narkotisierte Ratte wird auf einen temperierten Operationstisch auf den Rücken gelegt und fixiert. Die Temperatur wurde so vorgewählt, dass die rektal gemessene Körpertemperatur nicht unter 36°C abfiel, in der Regel 4-6°C höher lag. Der Bauchraum wird entlang der linea alba vom Xiphoid bis zur Symphyse eröffnet. Das Darmkonvolut wird von einer feuchten Kompresse (NaCl 0,9%) umhüllt (mit einer Plastiktasche eingefasst) und auf die linke Seite des Tieres gelegt. Der Bauchraum sowie die rechte Niere werden während der Präparation mit Kochsalzlösung feucht gehalten. Die Präparation des dorsalen Bauchraums erfolgt zunächst stumpf mit Watteträgern (Q-tips). Damit lässt sich auch das dorsale, dünne Peritoneum abschieben von den retroperitoneal liegenden Gefäßen. Der Ureter wird mit stumpfen Pinzetten aus seiner Umgebung gelöst und im Bereich der späteren Inzision wird die Adventitia mit den kleinen Begleitgefäßen abgelöst, distal wird er unterbunden und am Faden mit einer Bulldogklemme leicht angespannt. Zwei weitere Ligaturen werden wie in der Abb. 2.1. gezeigt angelegt und der Ureter wird zwischen diesen Ligaturen (Abbildung: Ziffern 1 und 2) ca. 1 cm unterhalb der Niere inzidiert, mit einer Uhrmacherpinzettenbranche vorgedehnt und mit einem kurzen Polypropylenkatheter (PP10) kanüliert. Der Ureterkatheter wird mit der Einbindeligatur befestigt und mit einem großkalibrigeren Polyethylenkatheter (PE50) verlängert. Alternativ wurden PE50 Katheter an einem Ende thermisch verdünnt ausgezogen, so dass sie das Kaliber des PP10 Katheters erreichten. Bei den single pass Experimenten, die ohne Kolloid durchgeführt wurden, wurde die Niere vor Beginn der Perfusion dekapsuliert. Dies führt in der Initialphase zu wesentlich besseren Flussraten, weil die Nieren rasch anschwellen und bei erhaltener Kapsel das eigene Gefäßbett einengen.

Gefäßpräparation:

Die Vena cava wird knapp unterhalb und oberhalb des Abganges der Vena renalis dextra mit einer Ligatur umschlungen [8 und 9]. In gleicher Weise wurden weitere Ligaturen um die Arteria mesenterica [7], A. renalis sinistra [6], die A. suprarenalis sowie um die Aorta oberhalb der A. mesenterica [4] und knapp oberhalb des Abganges der A. renalis sinistra [5] sowie im passenden Abstand nach caudal [3] vorgelegt. Vor dem Abbinden der Ligaturen werden 250 IE Heparin-Natrium in einen Leberlappen injiziert. Die Ligaturen um die A. mesenterica [7], die A. suprarenalis [10] und die Aorta caudal [3] werden verknotet. Die Niere wird mobilisiert und anatomisch korrekt in eine auf 37°C temperierte spezielle Metallschale gelegt. Zwischen dem Abgang der A. mesenterica und der mittleren Aortenligatur wird eine Gefäßklemme [A] gesetzt und die Aorta unterhalb der A. renalis sinistra als Zugang für die Perfusionskanüle [B] inzidiert. Nach dem Einbinden der doppelläufigen Perfusionskanüle (Außen-/Innendurchmesser der Außenkanüle: 1,45/1,0 mm und der Innenkanüle: 0,5/0,3 mm, für die Druckmessung) wird die proximale Aortenligatur geschlossen und die Perfusion mit einer Flussrate von 8ml/min begonnen. Wenige Minuten nach Beginn der Perfusion wird ein konstanter Perfusionsdruck von 90 mmHg (bei kolloidfreiem Perfusat, sonst 100mmHg) eingestellt. Das Tier wird mit dem Tischeinsatz über einen Scherenmechanismus abgesenkt und die Restverbindungen zum Tierkörper werden getrennt. Dann werden Blutreste abgespült und ein Effluatsammler untergeschwenkt und die darauf montierte Venenkanüle in die untere Hohlvene zur Nierenvene hin eingeschwenkt. Die verwendete venöse Edelstahlkanüle hat einen Außendurchmesser von 3,2 mm und ist drehbar um die Achse eines nach unten gerichteten T-Stücks, über das venöses Medium zur pO₂-Elektrode gelenkt werden kann. Bei Rezirkulation des Mediums wird das Effluat zurückgeführt, im single pass Modus verworfen. Im single pass Modus kann die Perfusion sehr rasch auf den konstanten Druck von 90 mmHg eingestellt werden, da genügend kolloidfreies Perfusat zur Verfügung steht, bei Rezirkulation geht man sparsamer mit dem Perfusionsmedium um (flusskonstant bis zum Schließen der Rezirkulation).

2.2. Perfusionstechnik mit Rezirkulation/Dialyse des Perfusats mit und ohne Zusatz von Erythrozyten.

Der Aufbau der Perfusionsapparatur ist in der Abbildung 7 schematisch dargestellt (75; 78; 79; 81). Alle wesentlichen Teile der Apparatur werden durch Wasserbäder auf 37-38°C erwärmt. Das Dialysat wird im Reservoir [1] mit Hilfe einer Gasmischpumpe (Wösthoff, Bochum) über eine Fritte mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast und mit der Rollerpumpe [2] über den Dialysator [3] ins Reservoir [1] zurückgeführt. Aus dem Reservoir [4] wird das albuminhaltige Perfusat zum Dialysator gepumpt [5], dort äquilibriert in Bezug auf die „Blutgase“ O₂ und CO₂ und dialysable Substanzen (z.B. Elektrolyte, Kreatinin, Harnstoff, Aminosäuren u.a. Arginin, Glukose und andere Substrate) und rezirkuliert, ein Aliquot wird mit der durch die Rückkopplung druckkonstant geregelten Rollerpumpe [6] schließlich zur Niere befördert.

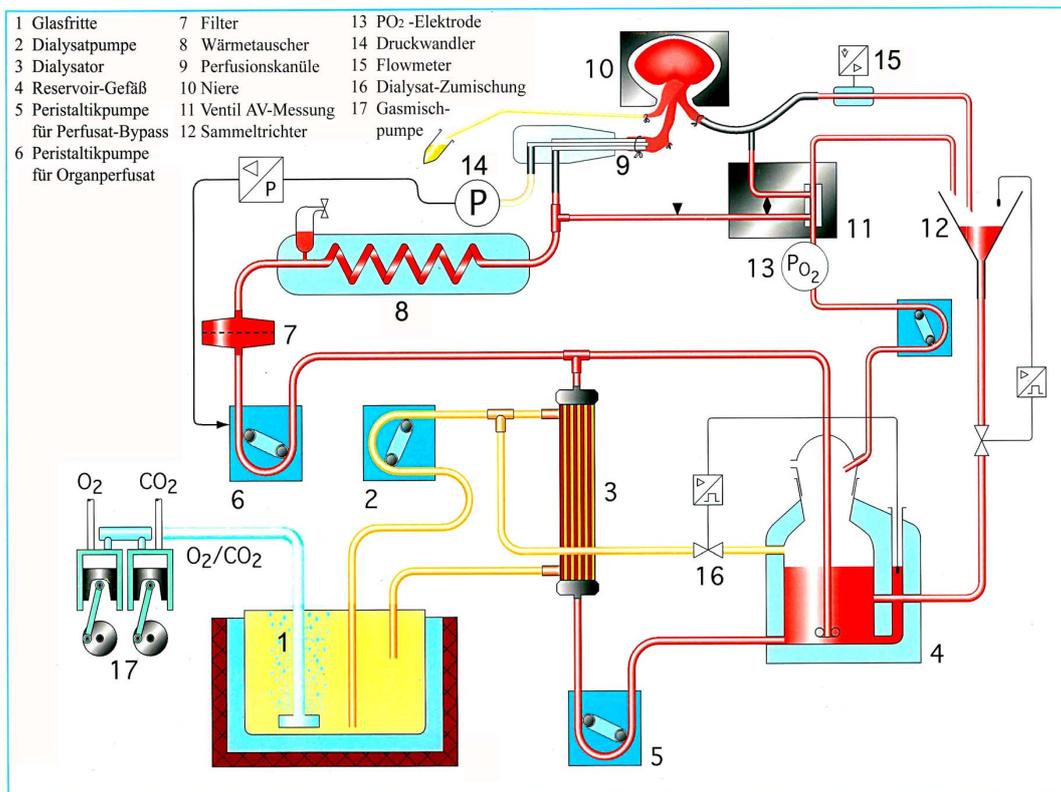


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur bei Perfusionstechnik mit Rezirkulation und Regeneration und Begasung des Perfusats durch Dialyse. Das venöse Effluat wird vom Trichter 12 über ein

Schlauchventil gesteuert schaumfrei zurückgeführt. Die Graphik wurde von Jörg-Dieter Biela erstellt, Medizinische Hochschule Hannover, Zentrum Innere Medizin, Abt. Nephrologie.

Auf dem Weg zur Niere sind bei zellfreier Lösung ein Feinfilter (8 μm) sowie eine Glas-Wärmeschlange [8] eingesetzt, darin ist ein Windkessel eingebaut zur Dämpfung von Pulsationen. Für den Fall, dass Pulsationen ganz bewusst erwünscht sind, kann der Windkessel ausgeklemmt werden, was zu einer Druckamplitude von ca. 20-30 mmHg führt. Nach Passage der Niere fließt das Perfusat passiv in das Reservoir [4] zurück. Der Sauerstoffdruck wird mit einer pO_2 -Elektrode (Fa. Eschweiler, Kiel) gemessen und aus venösen Werten und kurz im Wechsel gemessenen arteriellen Werten der O_2 -Verbrauch errechnet. Über einen Kompensationsschreiber (Rikadenki, Freiburg) werden kontinuierlich Perfusionsdruck, Flussrate (Analogsignal der Pumpenrevolution) und der pO_2 aufgezeichnet. Der pH-Wert wird punktuell mit einem Radiometer A 505 Blutgasanalysator gemessen gemeinsam mit pO_2 , pCO_2 , Na^+ , K^+ , Ca^{++} . Zum Ausgleich der Zwangsultrafiltration des Dialysators wurde der Perfusatpegel mit Sensoren überwacht und mit Zugabe von Dialysat automatisch auf Ausgangsniveau gebracht. Probenentnahmen wurden durch Nachjustierung kompensiert. Der entstehende Urin wurde in vorgewogenen Sammelgefäßen aufgefangen und der weiteren Analytik zugeführt (elektronische Feinwaage, Sartorius, Göttingen). Der Vorteil der oben genannten Perfusionstechnik mit Rezirkulation und Dialyse des albuminhaltigen Perfusats ist die der single-pass Technik vergleichbare Funktionskonstanz. Dem Perfusat können auch z.B. rote Blutzellen zugegeben werden. In diesem Typ von Experimenten mit 4 - 5 g% BSA (Rinderserumalbumin) wurden 5% mehrfach gewaschene Humanerythrozyten zugesetzt. Humanerythrozyten haben mit 7-8 μm etwa die gleiche Größe wie Rattenerthrozyten. Letztere wurden von der Arbeitsgruppe von Endre mit $7,4 \pm 0,2\mu\text{m}$ bestimmt (59).

Nach dem Gebrauch des Systems wurden alle Glasteile und Verbindungsschläuche gereinigt und desinfiziert: die Glasteile wurden bei 132°C hitzesterilisiert und die Schläuche nach Spülung mit Aqua dest im Trockenschrank bei 52°C getrocknet.

2.3. Perfusionstechnik im „single-pass“ Modus

Die Präparation der rechten Niere erfolgte genau wie bei der Perfusionstechnik mit Rezirkulation. In diesem Modus wurde die Niere mit einem reinen, in diesem Fall zellfreien Perfusat ohne Protein oder Kolloid in gleicher Technik perfundiert. Das Medium wird hierbei direkt über eine Glasfritte begast. Die folgende schematische Darstellung soll den single-pass-Perfusionsmodus wiedergeben.

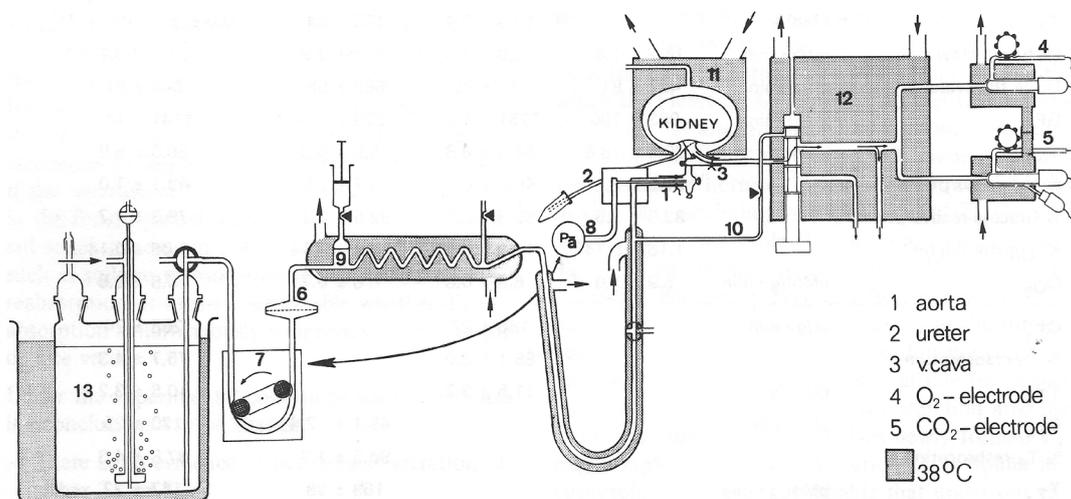


Abb. 2.3.: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur im single-pass-Modus. (1) Aorta, (2) Ureter, (3) Vena cava, (4) O₂-Elektrode, (6) Filter 8µm (optional), (7) Servopumpe Feedback gesteuert durch: (8) Druckaufnehmer mit doppelläufiger Perfusionskanüle, (9) Windkessel, (10) Bypass für arterielle Gasmessung, (13) Reservoir für Perfusat, nach (74).

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber der Rezirkulationstechnik mit Albumin als Kolloid besteht darin, dass die Niere vor Anschluss an die Perfusion dekapsuliert wurde. Das führt initial zu besseren Perfuionsraten und einer hohen glomerulären Filtrationsrate. Damit entstehen schon initial hohe Urinflussraten mit der Chance, sehr früh Urinproben zur Zellzählung zu erhalten. Eine wesentliche Voraussetzung für hohe Urinflussraten ist ein adäquat dimensionierter Ureterkatheter, der nicht zu einer Abflussbehinderung

führt (75). Da genügend Perfusionslösung zur Verfügung steht, kann kurz nach Anschluss der Niere vom flusskonstanten Modus auf den druckkonstanten Modus umgeschaltet werden, bei kolloidfreiem Perfusat auf 90 mmHg.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Perfusionsmediums für den single-pass-Modus (proteinfrei), für den Fall der Rezirkulation mit Dialyse Einsatz von BSA (bovines Serum-Albumin, jeweils 4-5 g%) waren 200 ml Perfusat und 5000 ml Dialysat im Einsatz, in der dritten Serie noch 5% mehrfach gewaschene, humane Erythrozyten im Perfusat.

Salze, Substrate, Peptidhormon	mM	Aminosäuren	mM
Natrium	140	Isoleucin	0,380
Kalium	5	Leucin	0,685
Calcium	1,00	Cystein	0,500
Magnesium	0,8	Lysin	0,560
Chlorid	105	Lysinmonohydrat	0,380
Bikarbonat	25	Methionin	0,590
Phosphat	0,72	Phenylalanin	0,570
Kreatinin	2 mg%	Threonin	0,705
Neomycinsulfat	1 mg%	Tryptophan	0,157
Glukose	8,4	Valin	1,060
Milchsäure	2	Arginin	1,320
Na-Pyruvat	0,33	Histidin	0,387
Na-Glutamat	1,3	Glutaminsäure	0,680
Oxalessigsäure	1	Glycin	3,200
Na-Malat	1	Asparaginsäure	0,840
Na- α -Ketoglutarat	1	Alanin	2,380
Na-Butyrat	1	Prolin	0,960
Glutathion	2	Serin	0,440
Acetat	0,56	Tyrosin	0,044
Zitronensäure H ₂ O	0,04	Acetylcystein	0,100
AVP optional	25 pM		

2.4. Funktionsanalyse der isolierten Niere

Zur Funktionsanalyse der isolierten Niere wurden Urinproben und das Perfusat untersucht. Natrium und Kalium wurden mit einem Flammenphotometer gegen einen Cäsiumstandard (IL590, Instrum. Laboratories, Lexington, MA, USA) gemessen, Chlorid mit einem elektronischen Titrationsgerät (Jokoo, Japan) und die Osmolalität mit einem Dampfdruckosmometer (Wescor, Logan, Utah, USA), später mit dem Osmomat auto der Fa. Gonotec, Berlin. Die Glukose wurde mit der Glukose-Oxidase-Methode und Kreatinin mit der kinetischen Jaffe-Reaktion im Autoanalyzer des Zentrallaboratoriums der Universitätsklinik Münster bestimmt. Die Urinvolumina wurden in vorgewogenen Gefäßen mit einer elektronischen Feinwaage (Fa. Sartorius, Göttingen) gravimetrisch bestimmt und protokolliert. Die Albuminkonzentration wurde entweder photometrisch mit der Biuretreaktion gemessen oder über den COP einer Eichreihe errechnet, der mit dem Osmomat 050 der Fa. Gonotec, Berlin, bestimmt wurde (Membran-Ausschlussgrenze: 20 000 Dalton).

2.5 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

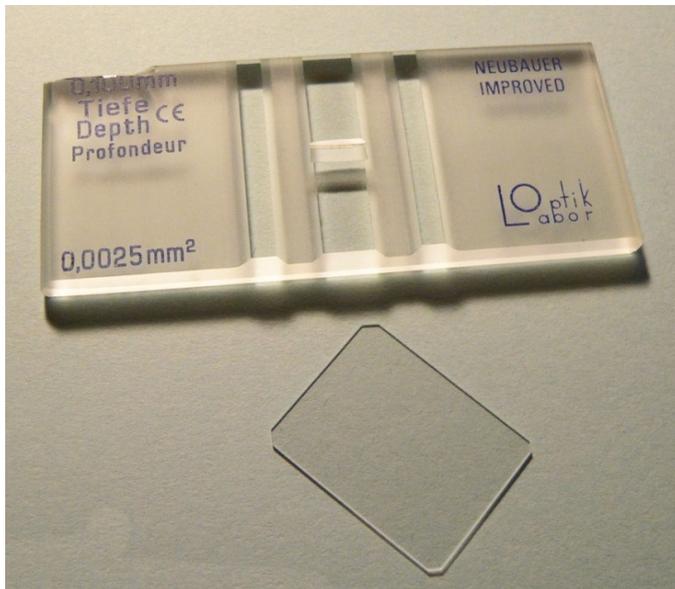
10 Tiere wurden jeweils vor den später geplanten Perfusionsexperimenten einzeln im Stoffwechselkäfig über 24h untersucht. Um eine Kontamination des Sammelurins zu vermeiden wurden die Tiere in dieser Zeit nur mit Trinkwasser versorgt. Bei einem Tier war das Sediment nicht auswertbar, weil sich ein Übermaß an Kristalloiden und Proteinkoagulat im Sediment fand.

2.6 Technik der Zellzählung mit Hilfe der Zählkammer

2.6.1 Über die Zählkammer

Die Zählkammer ist ein Präzisionsmeßgerät, das aus optischem Spezialglas hergestellt wird. Sie besteht aus einem Zwischenraum, der durch zwei ebene, in

geringem Abstand parallel angeordnete Glasflächen begrenzt ist. Sie dient zur visuellen Bestimmung der Teilchenzahl (Zellen, Bakterien, Pilzsporen) pro



Volumeneinheit einer Flüssigkeit. Das Bauprinzip aller gängigen Zählkammern, wie z.B. Neubauer-Improved, Fuchs-Rosenthal, Bürker-Türk und Thoma ist gleich. Der signifikante Unterschied der oben genannten Zählkammer liegt am Zählnetz, welches direkt in das Glas der Grundplatte

eingraviert ist. Die Grundplatte der Zählkammer besteht aus optischem Spezialglas und hat die Größe eines normalen Objektträgers für die Durchlichtmikroskopie, ist jedoch etwa 5 mm dick. Durch parallel zu den Schmalkanten verlaufende vier Rinnen im mittleren Drittel wird die Oberfläche der Grundplatte in 2 äußere breite Felder und 3 schmale innere Stege geteilt. Die beiden äußeren Felder sind unbearbeitet und dienen zur Kennzeichnung: das System des Zählnetzes, der Name und das Warenzeichen des Herstellers, die Kammertiefe in mm sind angegeben und die Fläche des kleinsten Quadrates in mm^2 . Der Mittelsteg und die beiden Außenstege sind geschliffen und poliert, wobei die beiden Außenstege die Auflage für das Deckglas bilden. In den Mittelsteg (Kammerboden) sind die Zählnetze eingraviert, dieser liegt in Bezug zu den Außenstegen in der Regel um 0,1 mm tiefer. Die Deckgläser für Zählkammern sind dicker, plangeschliffenen und haben polierte Oberflächen im Vergleich zu Deckgläsern für die normale Lichtmikroskopie. Der Spalt zwischen dem Kammerboden und der Unterfläche des aufliegenden Deckglases sowie die Grenzlinien des Zählnetzes bilden die Volumenbegrenzung der Zählkammer.

Abb. 2.4.: Bild der hier verwendeten Zählkammer vom Typ Neubauer Improved. An der Kante links oben sieht man die Kammertiefe mit 0,1 mm

angegeben, woraus sich mit der entsprechenden Fläche das Volumen der Zählkammer definiert. Das Deckglas ist ein speziell geschliffenes und biegestabiles Glas. Normale Deckgläser sind ungeeignet.

Zur Auswertung des Urins einer im Experiment perfundierten Niere wurde eine Zählkammer Neubauer-Improved mit doppelter Ausführung (zwei Zählnetze) von LO-Laboroptik Ltd, Lansing, UK verwendet.

Zu den Besonderheiten des Zählnetzes:

Das Zählnetz besteht aus 9 Großquadraten von je 1 mm^2 . Die 4 Großquadrate in den Ecken sind in je 16 Quadrate mit $0,25 \text{ mm}$ Seitenlänge unterteilt. Sie werden meistens für die Leukozytenzählung verwendet. Das Großquadrat in der Mitte ist in 5×5 Gruppenquadrate mit je $0,2 \text{ mm}$ Seitenlänge unterteilt. Die Fläche eines solchen Gruppenquadrats ist damit $0,04 \text{ mm}^2$. Jedes Gruppenquadrat besteht aus 16 Kleinstquadraten mit je $0,05 \text{ mm}$ Seitenlänge und somit einer Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$. Die (von links oben) diagonalen 5 Gruppenquadrate werden für die Erythrozytenzählung verwendet. Eine Besonderheit dieser Zählkammer besteht darin, dass alle Gruppenquadrate allseitig dreifache Grenzlinien aufweisen. Die mittlere Linie ist die Begrenzungslinie und entscheidet darüber, ob die Zellen im Grenzbereich mitzuzählen sind oder nicht.

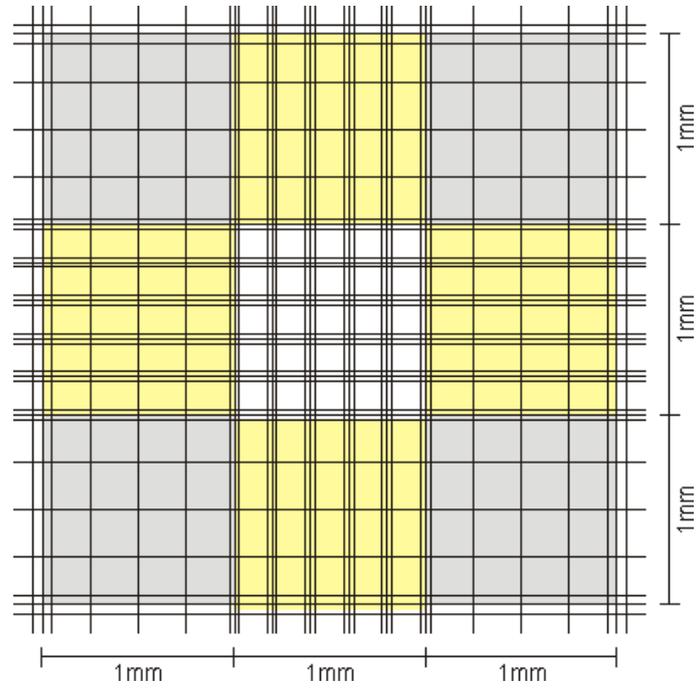


Abb. 2.5a.: Aufbau eines Gross-Zählfeldes bei der Zählkammer Neubauer-Improved.

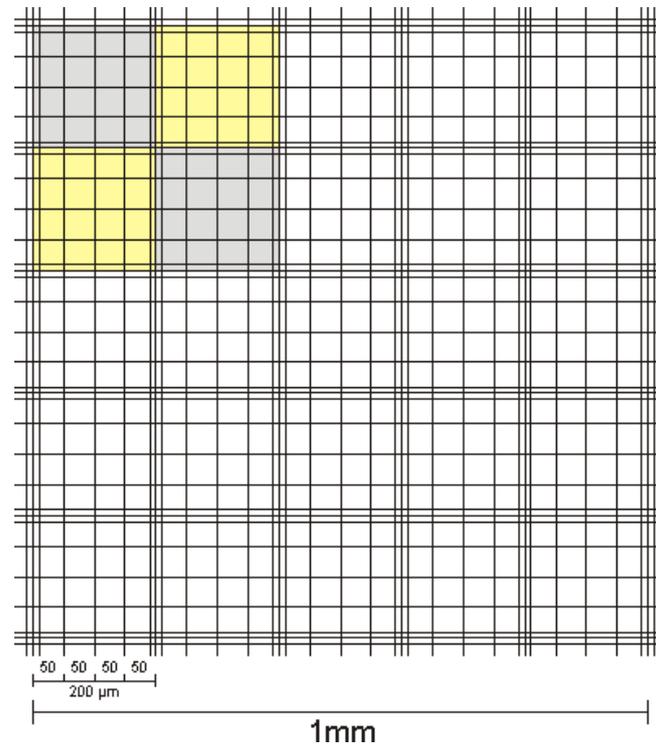


Abb. 2.5b.: Aufbau des zentralen Zählfeldes für die Erythrozytenzählung.
 Als Beispiel sind hier jeweils zwei Gruppenquadrate mit gelb bzw. grau markiert.

2.6.2 Erythrozytenzählung

Die Erythrozyten-Zählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer–Improved Zählkammer und eines Phasenkontrastmikroskops Carl Zeiss Primo Star mit x 40 Objektiv und x 10 Okular. Bei allen Erythrozyten-Zählungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach dem Auszählen des oberen Zählnetzes wurde als Kontrolle in gleicher Weise noch das untere Zählnetz ausgezählt. Der Mittelwert der Zählungen wurde dann in die Berechnungsformel eingesetzt bzw. mit dem entsprechenden Faktor multipliziert. Bei einigen Proben (z.B. bei sichtbarer Hämaturie) musste für eine bessere Beurteilbarkeit eine passende Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung erfolgen. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Ausrechnung entsprechend berücksichtigt. Bei größeren Zellmengen wurden wie empfohlen die 5 diagonalen Gruppenquadrate und bei geringen Zellmengen, um eine bessere Genauigkeit zu erhalten, die Gesamtfläche des zentralen Großquadrates ausgezählt. Beim Auszählen müssen die Grenzlinien der verwendeten Zählkammer berücksichtigt werden. Um die an den Begrenzungslinien liegenden Zellen nicht doppelt zu zählen oder bei der Zählung diese nicht zu übergehen hält man sich an eine bestimmte Regel: mitgezählt werden die an 2 Seiten, z.B. an der linken und oberen Maßlinie, an- oder aufliegenden Zellen.

Im Folgenden werden typische Ausrechnungsbeispiele dargestellt:

1. Für die Zählung in 5 Gruppenquadraten

- Ausgezählte Zellen 172 Erythrozyten
- Ausgezählte Fläche 5 Gruppenquadrate entsprechen 0,2 mm²
- Kammertiefe 0,1 mm
- Kammervolumen 0,02 µl
- Verdünnung 1/100

$$172 \cdot 100 / 0,2 \cdot 0,1 = 172 \cdot 100 \cdot 50 = 860000 \text{ Erythrozyten}/\mu\text{l}$$

Es gibt eine einfache Regel bei der Zählung in 5 diagonalen Gruppenquadraten ohne Verdünnung:

Zahl mal 50 ergibt die Zellzahl pro μl .

2. Für die Gesamtfläche (Großquadrat) ohne Verdünnung:

- Ausgezählte Zellen 135 Erythrozyten
- Ausgezählte Fläche eines Großquadrates entspricht 1 mm^2
- Kammertiefe $0,1\text{ mm}$
- Kammervolumen $0,1\mu\text{l}$

Somit 135 Zellen pro $0,1\text{ }\mu\text{l}$ oder 1350 Zellen pro μl

3. Patienten und Methodik

36

3.1 Patienten

Es wurden insgesamt 360 Patienten auf das Vorhandensein einer Mikrohämaturie untersucht, davon waren 256 Patienten unter Antikoagulationstherapie und 104 Patienten dienten als Kontrollgruppe. Alle Patienten wurden aus dem St. Bonifatius-Hospital in Lingen ausgewählt. Die mikroskopische Untersuchung eines nativen Spontanurins wurde in gleicher Technik wie im Tierexperiment mit Hilfe einer Neubauer-Improved Zählkammer und eines Phasenkontrastmikroskop Carl Zeiss Primo Star mit 40 x-Objektiv durchgeführt.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit einer bekannten urologischen Vorerkrankung (Malignom, Steinleiden) sowie Träger von urologischen Stents oder Dauerkathetern. Der Ausschluss erfolgte durch die Erhebung der Patientenanamnese und das Studieren der Patientenakte. Aus den Patientendaten wurden zur Einschätzung der Nierenfunktion das Serum-Kreatinin, die daraus per MDRD-Formel berechnete eGFR und das U-Protein

herangezogen. Bei der mikroskopischen Urinuntersuchung wurden in einzelnen Proben nebenbefundlich Bakterien, Leukozyten oder Harnkristalle dokumentiert.

3.1.1. Kontrollkollektiv

Alle Zellzählungen erfolgten als Doppelbestimmung. Als Kontrollkollektiv wurden 104 Patienten im Alter von 7 bis 94 Jahren aus der Notfall-Aufnahme des Bonifatius-Hospital Lingen rekrutiert. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 50 Jahren, eine Antikoagulationstherapie war ausgeschlossen. Trotz fehlender Selektion in Hinblick auf das Altersspektrum der Vergleichsgruppen entsprach das Befundspektrum der Erwartung, die man an ein Kontrollkollektiv haben kann.

3.1.2. Patienten unter Antikoagulation

Für diese Gruppe wurden 256 Patienten aus zwei Abteilungen des Bonifatius-Hospitals in Lingen rekrutiert, der Abteilung für Gefäßchirurgie und Kardiologie. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 69 Jahren. Die Patientendaten wurden nach Art der Antikoagulation in 3 Gruppen unterteilt: 1. Marcumar-Gruppe, 2. ASS-Gruppe und 3. ASS & Plavix-Gruppe.

4. Ergebnisse

4.1. Experimentell erhobene Daten zur Dynamik der Mikrohämaturie

Die Analyse des Zeitgangs der Ausscheidung roter Blutzellen in der isolierten Niere nach Beginn der Perfusion wurde in drei Serien untersucht. Die erste Serie erfolgte im „single-pass“ Modus zell- und kolloidfrei, die zweite Serie im Rezirkulationsmodus mit Dialyse und einem Perfusat mit ca. 5 g/dl Albumin

(BSA, bovines Serumalbumin) und die dritte Serie mit Zusatz von BSA und 5 % humanen Erythrozyten.

Tabelle 4.1.: Übersicht über die Funktionsparameter der IPRK im „steady state“ unter verschiedenen Bedingungen zwischen der 50. und 70.min. In single-pass Experimenten ohne Kolloidzusatz sind GFR und Urinzeitvolumina am höchsten, ebenso die Filtrationsfraktion, dagegen ist die absolut transportierte Natriummenge (T_{Na}) und die fraktionelle Natriumresorption am niedrigsten.

Parameter	Albumin	COP*	Perfusions	Urinzeit-	GFR	T_{Na}	Na-Re-	
			-rate	volumen	Inulin		sorption	
<i>Dimension</i>	g%	mmHg	ml/min g	μ l/min g	μ l/min g	μ mol/min g	%	
<i>Serie 1</i>								
<i>Single-pass</i>								
<i>zell- & kolloidfrei</i>	MW	0	0	23,8	896	1495	85,7	39,8
	SEM			$\pm 0,8$	± 37	± 22	$\pm 4,8$	$\pm 1,33$
	n	22	22	22	22	22	22	22
<i>Serie 2</i>	MW	4,66	15,6	30,5	226	960	108	82,6
<i>Rezirkulation</i>	SEM	$\pm 0,99$		$\pm 1,9$	± 71	± 80	± 7	$\pm 6,2$
<i>BSA zellfrei</i>	n	3	3	3	3	3	3	3
<i>Serie 3</i>	MW	4,79	16,4	22,6	213	1007	130,8	92,2
<i>Rezirkulation</i>	SEM	$\pm 0,19$	$\pm 0,9$	$\pm 1,5$	± 44	± 62	$\pm 8,4$	$\pm 2,0$
<i>BSA 5% Erys</i>	n	8	8	8	8	8	8	8

*der gemessene kolloidosmotische Druck lag niedriger als mit der Formel von Landis & Pappenheimer (45) zu errechnen ist: $2,8c + 0,18c^2 + 0,012c^3$, wobei c der Albuminkonzentration in g/100ml entspricht.

Serie 1	Parameter	Albumin	COP	U/P _{Kalium}	Glukose-	QO ₂	TNa/	Filtrations-
				U/P _{Inulin}	Resorption		QO ₂	Fraktion
Single-pass	Dimension	g%	mmHg		%	µmol/min g		%
Zell- & kolloidfrei	MW	0	0	1,11	79,0	6,98	15,3	6,27
	SEM			±0,02	±1,35	±0,21	±1,63	±0,15
	n	22	22	22	22	22	22	22
Serie 2	MW	4,66	15,6	1,61	91,6	8,89	12,3	3,14
Rezirkulation	SEM	±0,99		±0,14	±2,2	±0,79	±1,8	±0,15
BSA zellfrei	n	3	3	3	3	3	3	3
Serie 3	MW	4,79	16,4	1,26	96,7	9,25	14,4	4,56
Rezirkulation BSA 5%	SEM	±0,19	±0,9	±0,13	±0,2	±0,58	±1,1	±0,39
Erys	n	8	8	8	8	8	8	8

4.1.1 Single pass Modus mit zellfreier Perfusion

Bei den hohen Urinzeitvolumina der single-pass Experimente war eine sehr frühe Urinprobe zu gewinnen (2-5 min) im Unterschied zu den Serien in Rezirkulationstechnik mit Albumin bzw. Albumin plus 5% Erythrozyten. Erst so war erkennbar, dass zu Perfusionsbeginn hohe Zellzahlen im Sediment erscheinen.

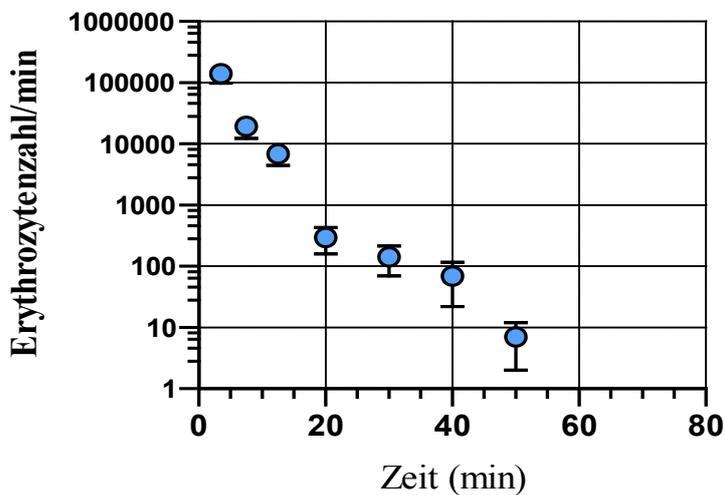
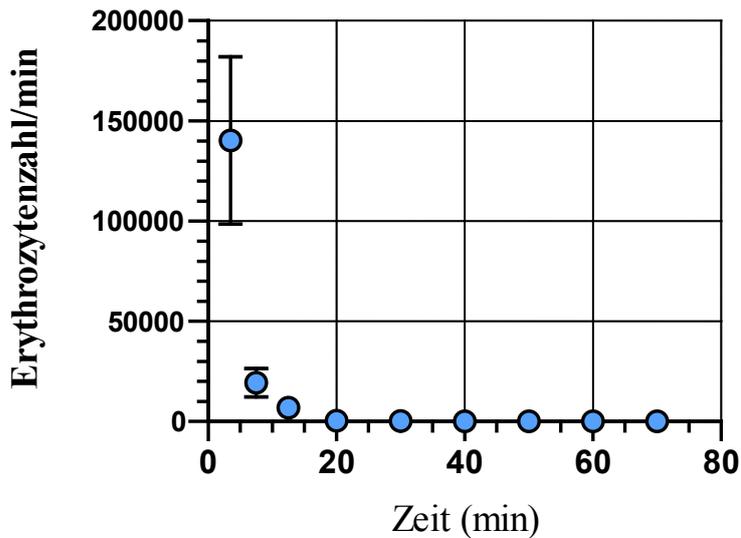


Abb. 4.1.1.: Zeitverlauf der Erythrozytenausscheidung in der ersten Versuchsserie. Single-pass Modus ohne Kolloid, lineare und halblogarithmische Darstellung. Bei hoher GFR und hohem Urinzeitvolumen sind nach 60 min praktisch keine Erythrozyten mehr im Urin-Sediment nachweisbar (MW \pm SEM, n=12).

4.1.2. Rezirkulationsmodus mit BSA, ohne und mit Erythrozyten-zusatz

Der Zusatz von BSA führt zu deutlich geringeren Urinzeitvolumina so dass Urinsedimente erst deutlich später gewonnen werden können, wenn man z.B. Osmodiuretika vermeiden will.

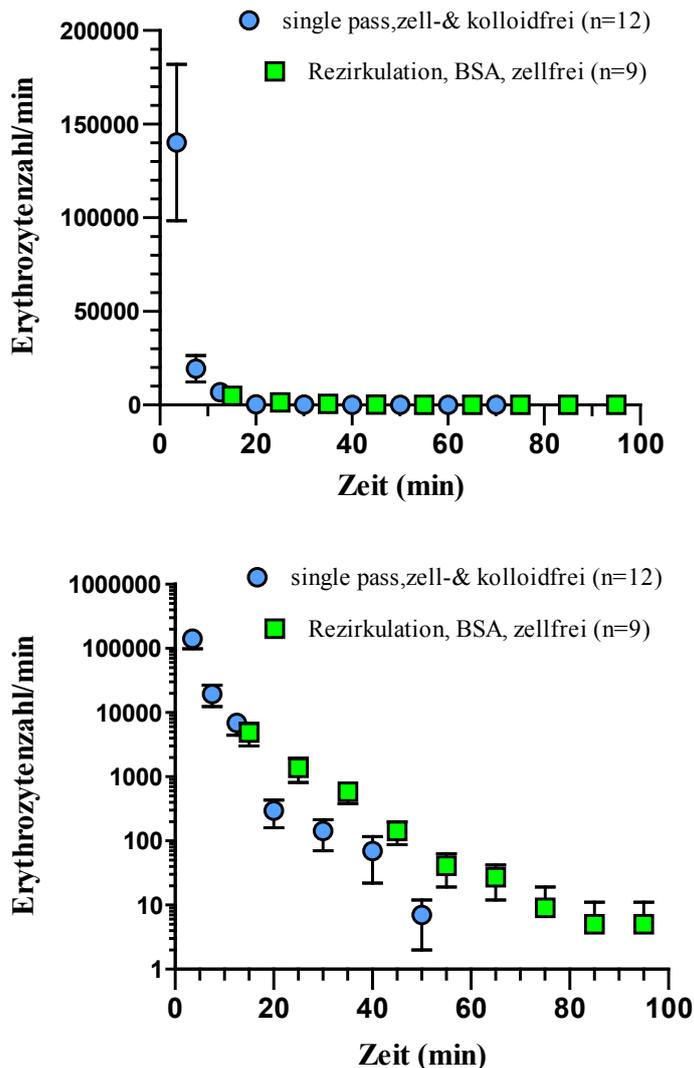


Abb. 4.1.2.: Zeitverlauf der Erythrozytenausscheidung, linear und halblogarithmisch aufgetragen im Vergleich der ersten Versuchsserie im single-pass Modus ohne Kolloid mit der zweiten Serie im Rezirkulationsmodus mit BSA. Halblogarithmisch zeigt sich die Rechtsverschiebung der 2. Serie (MW±SEM). Im single pass Modus sind Urinproben deutlich früher zu gewinnen wegen der auch initial viel höheren Urinzeitvolumina (s.a. Tab. 4.1).

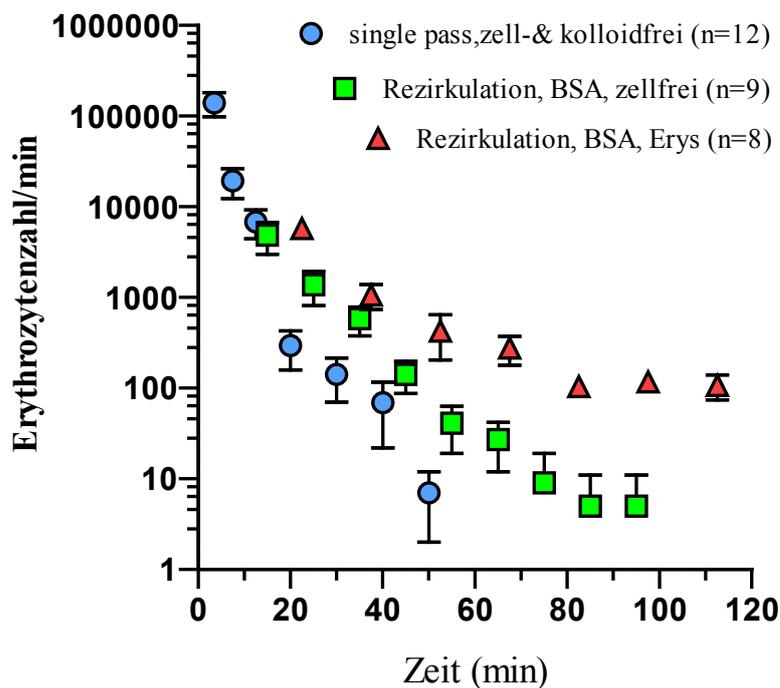
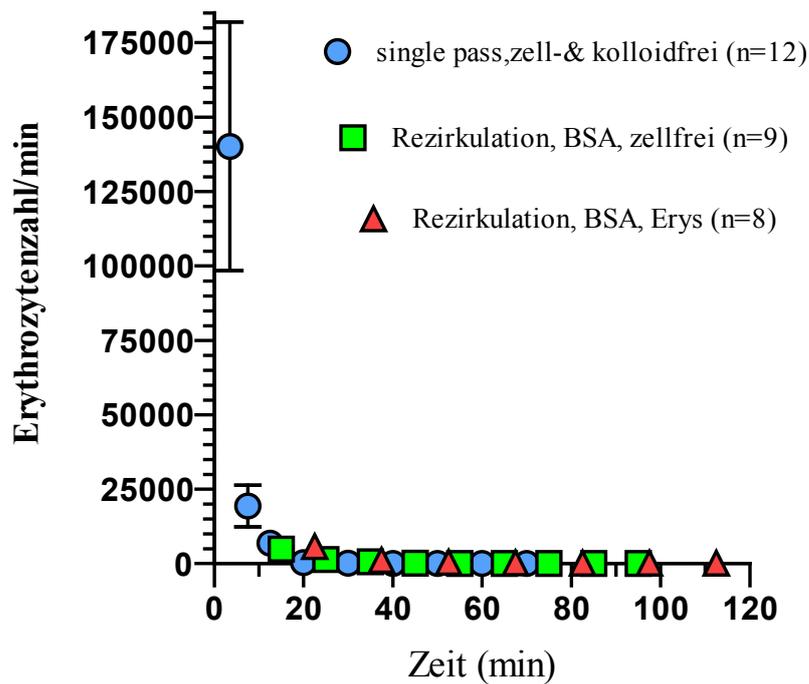


Abb. 4.1.3.: Zeitverlauf der Erythrozyten Ausscheidung, linear und halblogarithmisch aufgetragen im Vergleich aller drei Serien. Der Zusatz von 5% Erythrozyten führt zu einer Resthämaturie, die auch nach 2 Stunden noch in der Größenordnung von ca. 100 Zellen pro Minute fortbesteht (MW±SEM).

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse der 3. Versuchsgruppe mit 5% Erythrozytenzusatz ist dies in der folgenden Abbildung noch einmal vergrößert dargestellt.

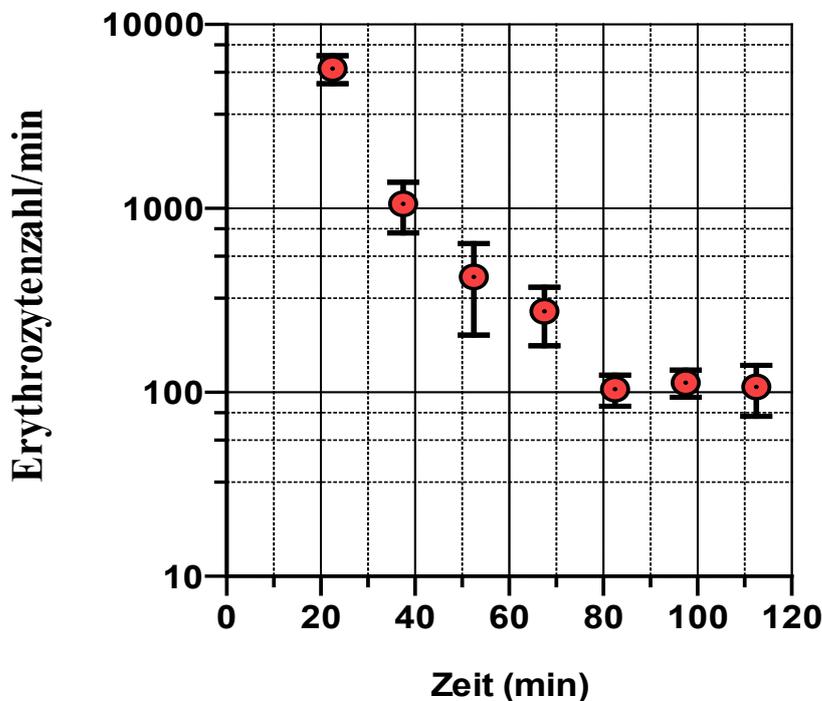


Abb. 4.1.4.: Zeitverlauf der Erythrozytenausscheidung in Gruppe 3, verkürzte Ordinate. Die verbleibende Mikrohämaturie in der 3. Serie wurde aus 11 Zellzählungen im Zeitraum zwischen 75 und 120 min von 6 Experimenten errechnet und ergab im Mittel (MW±SEM) 115±20 Erythrozyten pro min. In diesem Zeitraum sind zum Vergleich bei zellfreier Perfusion und hoher GFR keine Erythrozyten im Urin mehr nachweisbar.

Bezieht man die Passage von Erythrozyten durch die glomerulären Kapillaren auf die Zahl der Glomeruli von 30.000/Niere käme man im „steady state“ auf eine Passagezeit von 260min pro Erythrozyt und das ist unrealistisch. Da in früheren Untersuchungen durch frühproximale Mikropunktionsproben eine Fraktion von 16% der Glomeruli eine hohe Albuminurie aufwiesen (81), während die restlichen Proben nahe der in vivo Werte lagen könnte man diese 16% als Basis für eine Neuberechnung zugrunde legen, als mögliche Passageorte. Bei 4.800 Glomeruli (16% von 30.000) mit einem entsprechenden

Leck für Durchwanderungs-Erythrozyten käme man dann auf eine Penetrationszeit von 42 Minuten pro Erythrozyt. Das entspricht grob der Zeit, nach der keine Erythrozyten mehr im Sediment bei zellfreier Perfusion nachweisbar sind. Die Größe von Rattenerythrozyten ist mit $7,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vergleichbar mit Humanerythrozyten (59).

Um eine Vergleichsmöglichkeit zur in vivo Situation zu bekommen, wurden zusätzlich Untersuchungen zur Mikrohämaturie über 24 h im Stoffwechselkäfig durchgeführt.

4.1.3. Untersuchung der Mikrohämaturie im Stoffwechselkäfig

Um abschätzen zu können, wie hoch die Mikrohämaturie bei der Ratte unter in vivo Bedingungen ist, wurden insgesamt 10 Tiere über 24h im Stoffwechselkäfig untersucht und folgende Befunde erhoben.

Tab. 4.2.: Basisparameter der im Stoffwechselkäfig untersuchten Tiere.

Die Zahl der ausgeschiedenen Erythrozyten im über 24 h gesammelten Urin ist einmal umgerechnet auf eine Minute und dann noch einmal auf eine Einzelniere, um mit der IPRK vergleichbar zu sein. Bei einem Tier war das Sediment nicht auswertbar (ausgefällter Proteinniederschlag).

	Erys im	Erys/	E/min	Urinvol/	Pcreat	Ucreat	GFR
	Urin/24h	min	EZN	24h in μl	mg%	mg%	$\mu\text{l}/\text{min}$
MW	2307	1,60	0,80	18811	0,371	60,1	1908
SEM	± 461	$\pm 0,32$	$\pm 0,16$	± 2773	$\pm 0,015$	$\pm 6,1$	± 40
n	9	9	9	8	8	8	8

	UNa	UK	Uosmol	Na exkr	K exkr
	mmol/l	mmol/l	mosmol	μmol	μmol
MW	45,3	127,7	751,4	749,4	2219,1
SEM	$\pm 8,0$	$\pm 11,0$	$\pm 66,0$	$\pm 88,0$	$\pm 160,4$
n	8	8	8	8	8

Alle miterhobenen Daten wie Urinvolumen, GFR als endogene Kreatininclearance, Natrium und Kaliumausscheidung sind im erwarteten Bereich. Die Ausscheidung von Erythrozyten ist mit 2.307 Erys/24 h niedriger als von humanen Verhältnissen erwartet. Dies sind umgerechnet 1.154 Erys/24h und Einzelniere und auf 30.000 Nephronen bezogen 0,038 Erythrozyten/24h und pro Glomerulus. Dies ist eine Größenordnung niedriger, als man es vom Menschen kennt (1-2 Erythrozyten/24h und Glomerulus). Um es mit den Daten der isolierten Niere zu vergleichen kommt man bei Umrechnung/min auf 0,8 Erythrozyten/min und Niere, sodass im „steady state“ an der mit 5% Erythrozyten perfundierten Niere 100mal mehr Erythrozyten/min ausgeschieden werden als unter in vivo Bedingungen im Stoffwechselkäfig.

Probleme der ersten und letzten Versuchsreihen

Im Rahmen der ersten Experimente, die im Labor in Münster durchgeführt wurden kam es gelegentlich noch in der in vivo Phase zu einer Einblutung in den Ureterkatheter. Dann war im Sediment ein deutlicher „roter Fleck“ in den ersten Urin-Sedimenten zu sehen und die Zellzahl war dementsprechend so hoch, dass nur mit adäquater Vorverdünnung gezählt werden konnte. Auch unter der zunächst verwendeten ersten Albumin Charge, die mit einer ungewöhnlich niedrigen GFR verbunden war kam es zu höheren Zellzahlen im Urinsediment bei Einsatz von gewaschenen Humanerythrozyten, deutlich höher als die historischen Daten, die zur Erstpublikation geführt hatten (72). Dass es Albumin-Chargen gibt, die Probleme bereiten ist in der Literatur selten vermerkt, aber wohl den meisten Arbeitsgruppen bekannt. Eine plausible Ursache ist nicht bekannt. Die meisten Autoren verwenden das Rinderserumalbumin erst nach intensiver Dialyse um es von an Albumin gebundenen Substanzen zu befreien. Wird Albumin in der filtratmindernden Konzentration von 7 g% und höher eingesetzt, scheint dies keine so große Rolle zu spielen wie man aus der Diskussion in einer Übersichtsarbeit von Maack ableiten könnte (46), der die Aufreinigung von Albumin (BSA) durch Dialyse kritisch sieht, zumindest was überlange Aufreinigung durch Dialyse angeht und insbesondere eine Entfernung von Fettsäuren durch Aktivkohle. Bekerski verzichtet bewusst ganz

auf Aufreinigung jeder Art bei reiner Rezirkulation (7), beschränkt sich aber auch auf pharmakologische Untersuchungen.

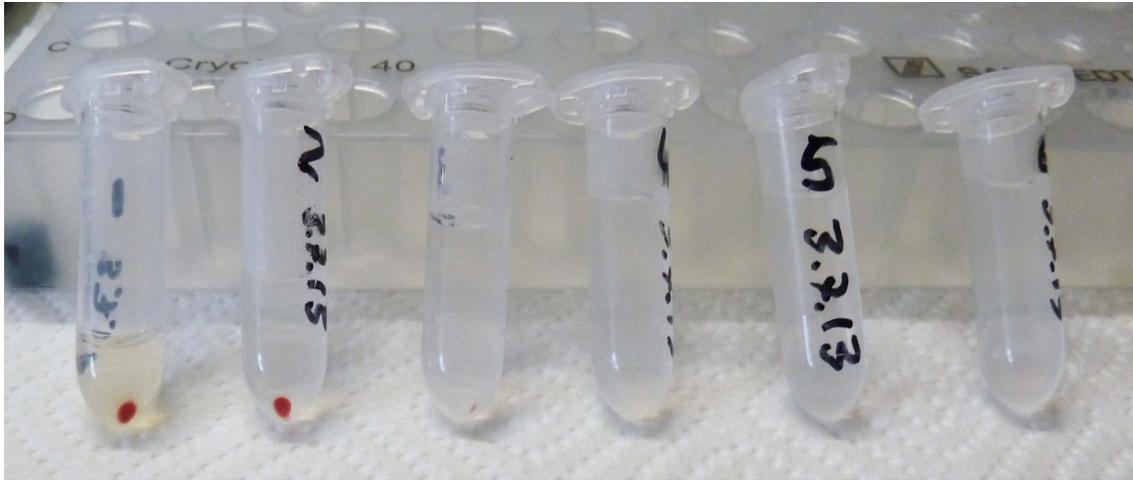


Abb. 4.1.4.: Makrohämaturie mit deutlich sichtbarem Erythrozytensediment, mutmaßlich nach Läsion von Nierenbecken oder Papille mit der Spitze des Ureterkatheters. Die Zellzahl in Probe 2 lag noch um eine Zehnerpotenz höher als im Restkollektiv der Serie 2 (Rezirkulation, BSA, zellfrei). Der kleine Fleck der 3 Probe entspricht dem, was ohne Läsionen zu sehen war.

46

Aus dieser ersten Serie haben wir gelernt, dass die Position der Spitze des Ureterkatheters deutlich außerhalb des Nierenbeckens liegen sollte und dass ein schonender Umgang mit dem Ureter bei der Katheteranlage essentiell ist. Der zuletzt verwendete Kathetertyp war ein thermisch auf PP10 Maß ausgezogener PE50 Schlauch (Polyethylen). Im Unterschied zum früheren Vorgehen wurde der Ureter erst am Ende der Präparation kurz vor Anschluss an die Perfusionsapparatur kanüliert. Bei der Präparation des Ureters ist es für diese Arbeit auch notwendig gewesen die Adventitia des Ureters mit seinen kleinen Blutgefäßen soweit abzutrennen, dass keine Kontamination mit Blut nach dem Anschnitt und bei der Kanülierung des Ureterlumens entsteht.



Abb. 4.1.5.: Beispiel für eine artifizielle Läsion mit Einblutung ins Nierenbecken. Die Makrohämaturie mit sichtbar rotem Punkt im Sediment hat in diesem Fall bei zellfreiem Perfusat über mehr als 90 min andauert. Die rechte Nierenhälfte zeigt ein Blutdepot bzw. Blutkoagel im Nierenbecken, die linke Nierenhälfte zeigt eine feine Zeichnung von Vasa recta im Nierenmark. Die Nieren wurden am Perfusionsende grundsätzlich mit einem Saggitalschnitt in dieser Form auf Auffälligkeiten hin untersucht, im Zweifel auch zusätzlich mit Hilfe eines Aufsichtsmikroskops.

Bei der letzten Versuchsreihe, die wir durchgeführt haben um noch mehr Material für die Experimentelle Gruppe Rezirkulation/Dialyse mit 5 g% Albumin und 5% Erythrozytenzusatz zu gewinnen, waren drei Experimente im erwarteten niedrigen Zellzahlbereich, drei weitere hatten deutlich höhere Zellzahlen. Mögliche Ursachen werden im Abschnitt Diskussion ausführlich behandelt.

4.1.4. Tubulusepithelien im Urinsediment

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Urinsediments der zellfrei perfundierten Rattenniere wurde erstmals ein besonderes Phänomen beobachtet. Ab der 30. Minute der Perfusion im Rezirkulationsmodus mit BSA als Kolloid tauchten im Urin vereinzelt Epithelien bzw. Epithelfragmente auf. Im weiteren Verlauf der Perfusion nahm die Ausscheidung von Epithelfragmenten sichtbar zu. In der 2 Stunde der Perfusion erreichte die Epithelzellausscheidung ihr Maximum. Bei den kolloidfrei perfundierten Nieren im single pass Modus war der Anstieg etwas früher, wahrscheinlich wegen der höheren Urinzeitvolumina und erreichte gleich sein Maximalniveau.

Bei Zusatz von 5% gewaschenen Erythrozyten zum Perfusat war dieses Phänomen wegen der besseren Sauerstoffversorgung nicht zu beobachten. Eine Erklärung für das Auftauchen von Epithelzellen im Urinsediment oder epithelialen Fragmenten sind tubuläre Schäden, die bei zellfreier Perfusion bekanntermaßen durch Gewebshypoxie entstehen und die auf das Areal zwischen den Vasa recta Gefäßbündeln des äußeren Nierenmarks beschränkt sind, wie aus früheren Untersuchungen bekannt ist (1; 80).

Das spezifische Muster der Hypoxieschäden ist von der komplexen Architektur der Gefäßversorgung im äußeren Nierenmark bestimmt. Es betrifft das S₃ Segment der proximalen Tubuli und den dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife im Interbündelareal; die hierzu gehörigen Nephrone sind die von kortikalen und midkortikalen Glomeruli, während die entsprechenden Tubuli der juxtamedullären Glomeruli aus der Radiärversorgung der Gefäßbündel mit Sauerstoff profitieren und keine Schäden zeigen. Daraus lässt sich erschließen, dass die im Urin bei der zellfreien Perfusion festgestellten Epithelfragmente tubulärer Herkunft sind und offensichtlich keinen Einfluss auf die glomeruläre Permeabilität haben. Die Epithelzellausscheidung wurde bis 110 min verfolgt (n = 11), danach nur noch bei 2 Experimenten.

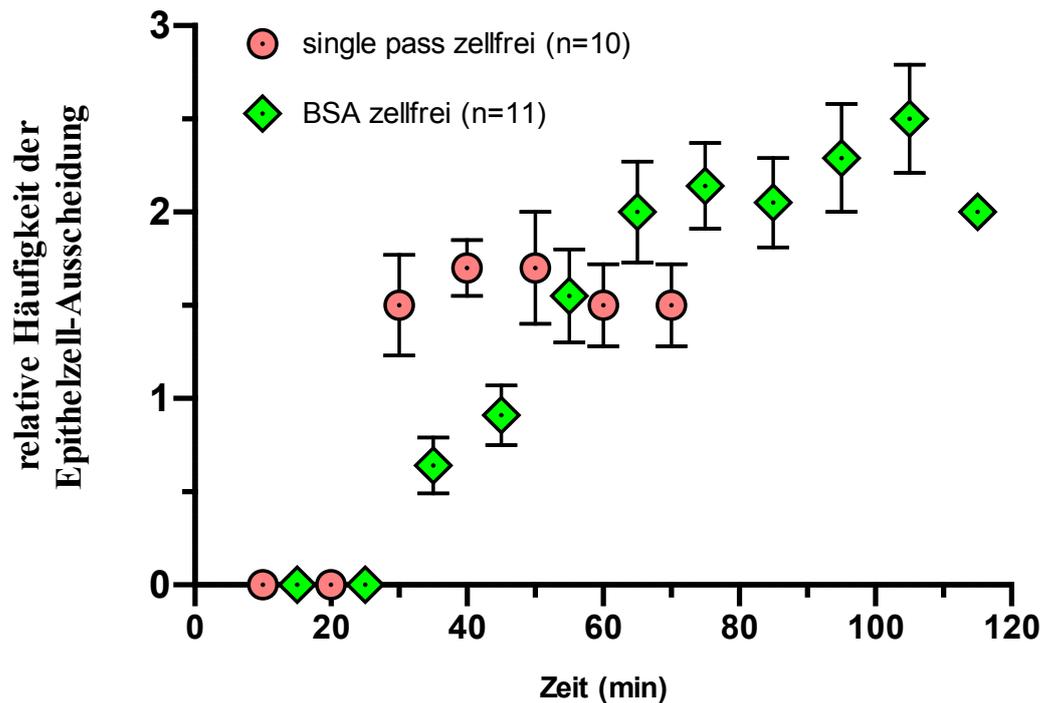


Abb. 4.1.6.: Häufigkeit der Epithelzellausscheidung über die Zeit in relativen Einheiten. Die Zahlen wurden nach der Häufigkeit von Epithelzellen und Epithelzellfragmenten in der Zählkammer in den Stufen 0-3 quantifiziert. Ausgewertet wurden 11 Experimente in Rezirkulationstechnik mit Albumin (BSA) und zellfrei perfundierten Nieren (Mittelwerte \pm SEM) und 10 Experimente im single pass Modus ohne Kolloid und ebenfalls zellfrei. Die Tubulusepithelien tauchen ab 25-30 min erstmals auf, im single pass Modus sehr rasch und deutlich, im Rezirkulationsmodus mit BSA als Kolloid etwas verzögert und langsam zunehmend. Bei Experimenten in Rezirkulationstechnik mit BSA und Zusatz von 5% Erythrozyten waren keine Epithelzellen oder Fragmente im Urinsediment nachweisbar, bedingt durch die bessere Sauerstoffversorgung.

4.2 Daten der Patientenkollektive

Neben Alter und Geschlecht wurden folgende Laborparameter herangezogen: Serum-Kreatinin, daraus errechnete eGFR, Urin-Protein und neben der Erythrozytenzahl in der Zählkammer Besonderheiten des mikroskopischen Harnbefundes. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung des Urinnormbefundes. Als normal gilt wenn,

- weniger als 3 Erythrozyten pro Gesichtsfeld bei 400er-Vergrößerung oder
- weniger als 5 Erythrozyten pro μl d.h. 5000 Erythrozyten pro ml Spontanurin zu finden sind (4; 8; 97; 98).

Die Prävalenz der asymptomatischen Mikrohämaturie ist altersabhängig und wird in 0,25–1% bei Schulkindern, in 3,5–14,2% bis zu einem Lebensalter von 40 Jahren und bei 13–22% der Bevölkerung über 50 Jahren nachgewiesen (4; 8).

50

4.2.1 Kontrollkollektiv

Die Kontrollgruppe bestand aus 50 männlichen und 54 weiblichen Patienten, die im Mittel 20 Jahre jünger waren als die Patientengruppe unter Antikoagulationstherapie.

Die Gruppe war zum Vergleich und zur Validierung der Methoden mit aufgenommen worden und lag bei den Analysen im erwarteten Normbereich. Die mikroskopische Urinuntersuchung der 104 Patienten in der Kontrollgruppe nach oben genannten Kriterien hat nur bei 10 Patienten (ca. 10%) eine geringe Mikrohämaturie ergeben, jeweils 8 bis 10 Erythrozyten/ μl und je einmal bis 20 und bis 30/ μl . Von diesen 10 Patienten waren 4 jünger als 30 Jahre. In Hinblick auf die geringe Mikrohämaturie dieses Kontrollkollektivs war eine altersgerechte Anpassung an die Patientengruppen unter Antikoagulantien entbehrlich.

Tabelle 4.2.1.: Mittelwertstatistik des Kontrollkollektivs.

Das mittlere Serumkreatinin, die mit der MDRD-Formel errechnete glomeruläre Filtrationsrate (eGFR), das Urineiweiß und die geringe Zahl an Erythrozyten weisen das Kontrollkollektiv aus. Die übrigen mikroskopisch aufgefallenen Besonderheiten waren bis auf je 1 Fall im Kollektiv der männlichen Patienten nur im weiblichen Kollektiv zu finden (50 männliche, 54 weibliche Patienten, Altersspanne 7-94 Jahre). Die komplette Tabelle findet sich im Tabellarium des Anhangs.

Kontrolle							
	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/μl	U-Protein	Besonder-
	Jahre	mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	49,6	0,85	93,1	0,13	1,25	4,3	10 x Bakterien
SEM	2,20	0,03	2,91	0,04	0,43	1,82	10 x Leukozyten
n	104	104	104	104	104	104	

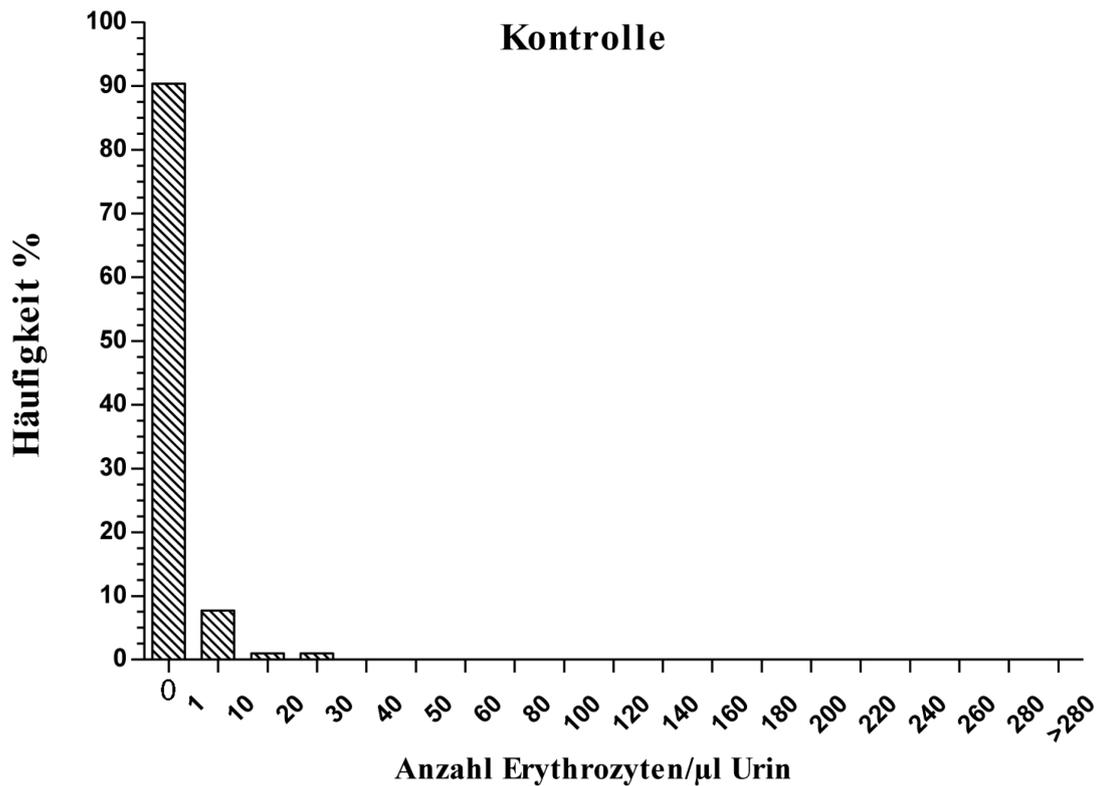


Abb. 4.2.1.: Häufigkeitsverteilung der ausgeschiedenen Erythrozyten. Die 90% Säule entspricht der Klasse < als 1 Erythrozyt/µl Urinprobe. Trotz des breiten Altersspektrums sind nur bei 10% der Patienten geringe Erythrozytenzahlen >1/µl auszählbar gewesen, die dem Streifentest wohl entgangen wären, 98% hatten weniger als 10 Erythrozyten/µl.

Kontrolle Gesamtkollektiv Häufigkeitsanalyse (HÄ)			
Erys/μl	Klassen	HÄ	HÄ in %
0 bis	0	94	90,3
1 bis	10	8	7,7
10 bis	20	1	1
20 bis	30	1	1
30 bis	40	0	
40 bis	50	0	
50 bis	60	0	
60 bis	80	0	
80 bis	100	0	
100 bis	120	0	
120 bis	140	0	
140 bis	160	0	
160 bis	180	0	
180 bis	200	0	
200 bis	220	0	
220 bis	240	0	
240 bis	260	0	
260 bis	280	0	
	>280	0	
	Summe	104	100

Von 104 mikroskopischen Kontrollanalysen waren 94 ohne Nachweis von Erythrozyten (90% <1/ μ l), bei 8 Proben fanden sich bis zu 10 Erythrozyten/ μ l, das sind 8%, 2 weitere Proben bis 30/ μ l, je 1%. Daraus errechnet sich eine mittlere Ausscheidung von 1,3 Erythrozyten/ μ l, hochgerechnet auf ein Urinvolumen von 2000ml/24h entspricht dies einer mittleren Zellausscheidung von 2×10^6 Erythrozyten/24h und das ist der Bereich von $2-4 \times 10^6$ Erythrozyten, den man statistisch von einem Normalkollektiv erwarten würde. Umgerechnet auf ein Glomerulus ergibt dies 1-2 Erythrozyten/Glomerulus und 24h. Die Häufigkeitsanalyse ist in Klassen aufgeteilt, die im Wesentlichen ausgerichtet ist nach

der höheren Ausscheidung von Erythrozyten unter Antikoagulation mit Phenprocoumon, ASS und der Kombination von ASS und Clopidogrel. In der graphischen Darstellung der Kontrollgruppe entspricht die linke Säule der Zellzahl 0, erst die nächste Klasse von 1-10 entspricht praktisch gezählten roten Blutzellen. Diese Datenlage bildet die durchschnittliche Bevölkerung als Kontrollkollektiv gut ab.

4.2.2 Patienten unter Phenprocoumon (Marcumar®)

Bedingt durch die Vorerkrankungen an Herz und Gefäßen ist diese Patientengruppe ca. 20 Jahre älter als die Kontrollgruppe der Notfall-Aufnahme, im Mittel 69 Jahre. Dem entsprechend ist das Serum-Kreatinin leicht erhöht, die errechnete eGFR mit 65ml/min erniedrigt und im Mittel findet sich etwas mehr Protein im Urin.

Tabelle 4.2.2.: Mittelwertstatistik der Phenprocoumon-Gruppe. Bei 51% der Patienten findet sich keine nennenswerte Mikrohämaturie (91% bei den Kontrollen). In den folgenden Klassen bis 60 Erythrozyten/ μ l ist aber deutlich mehr zusehen als bei den Kontrollen, wie man aus der Häufigkeitsanalyse in Abb. 3.1.2. ersehen kann (53 männlich, 48 weibliche Patienten, Altersspanne 41-90 Jahre).

Marcumar®							
	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/μl	U-Protein	Besonder-
		mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	69,3	1,26	65,5	3,2	31,9	12,4	8 x Bakterien
SEM	1,07	0,08	3,25	0,72	7,24	3,05	3 x Uratkristalle
n	101	101	101	101	101	97	

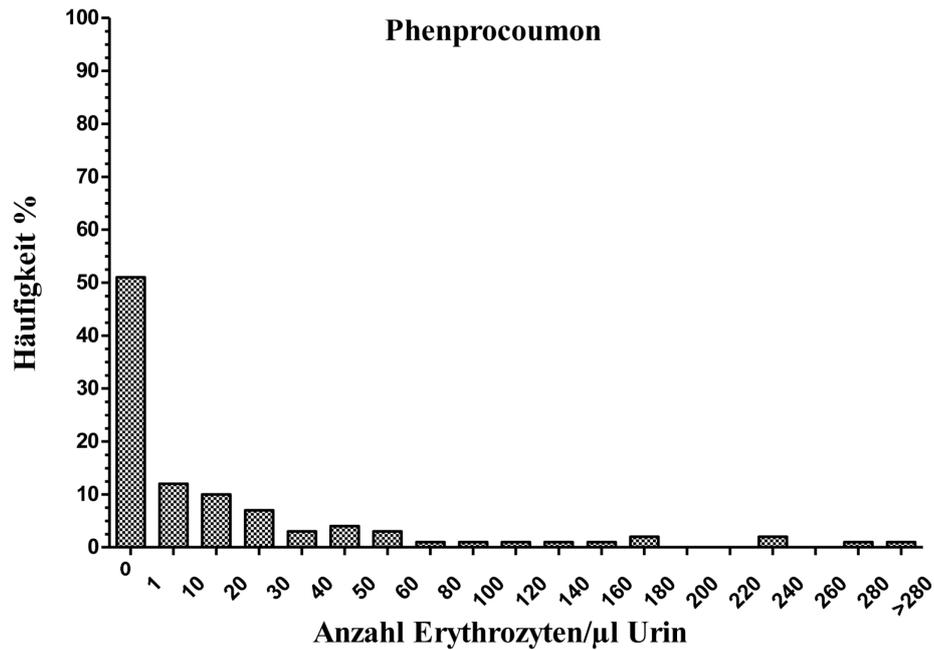


Abb. 4.2.2.: Die Häufigkeitsverteilung unter Marcumar®. Die Klassen sind von 1-60 Zellen in Schritten zu je zehn Zellen aufgeteilt, danach in 20er Schritten. Von den 101 Patienten fanden sich in der Klasse 0 Erythrozyten 51% der Patienten, in den folgenden Klassen bis 10E/µl 12%, bis 20E/µl 10%, bis 30E/µl 7%, bis 60 Erythrozyten/µl noch jeweils 3-4%, vereinzelt noch in den höheren Klassen, wie in der Graphik zu sehen ist. Die vollständige Tabelle findet sich im Anhang.

4.2.3 Patienten unter Acetylsalicylsäure (ASS, Standarddosis 100 mg)

Diese Gruppe zeigt das gleiche Altersspektrum wie die Marcumar-Gruppe mit einer im Mittel gering besseren Nierenfunktion, einer im Mittel höheren Ausscheidung von Erythrozyten aber keiner höheren Proteinausscheidung. Insbesondere unterscheidet sich die Zahl der Patienten ohne Mikrohämaturie mit 19% deutlich von der Marcumar Gruppe.

Tabelle 4.2.3.: Mittelwertstatistik der ASS-Gruppe. Unter der Rubrik Besonderheiten ist zumindest erwähnenswert, dass recht häufig Uratkristalle im Unterschied zur Kontroll- und zur nachfolgenden Gruppe in der Kombination ASS mit Clopidogrel gesehen wurden. Die höhere Ausscheidung roter Blutzellen ist in der Häufigkeitsanalyse der Abb. genauer erfasst (63 männlich, 41 weibliche Patienten, Altersspanne 29-93 Jahre).

ASS 100							
	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/μl	U-Protein	Besonder-
	Jahre	mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	69,2	1,13	70,9	5,7	57,2	10,8	14 x Bakterien
SEM	1,3	0,06	2,73	1,4	14,3	2,9	1 x Leukozyten
n	104	104	104	104	104	53	8 x Uratkristalle

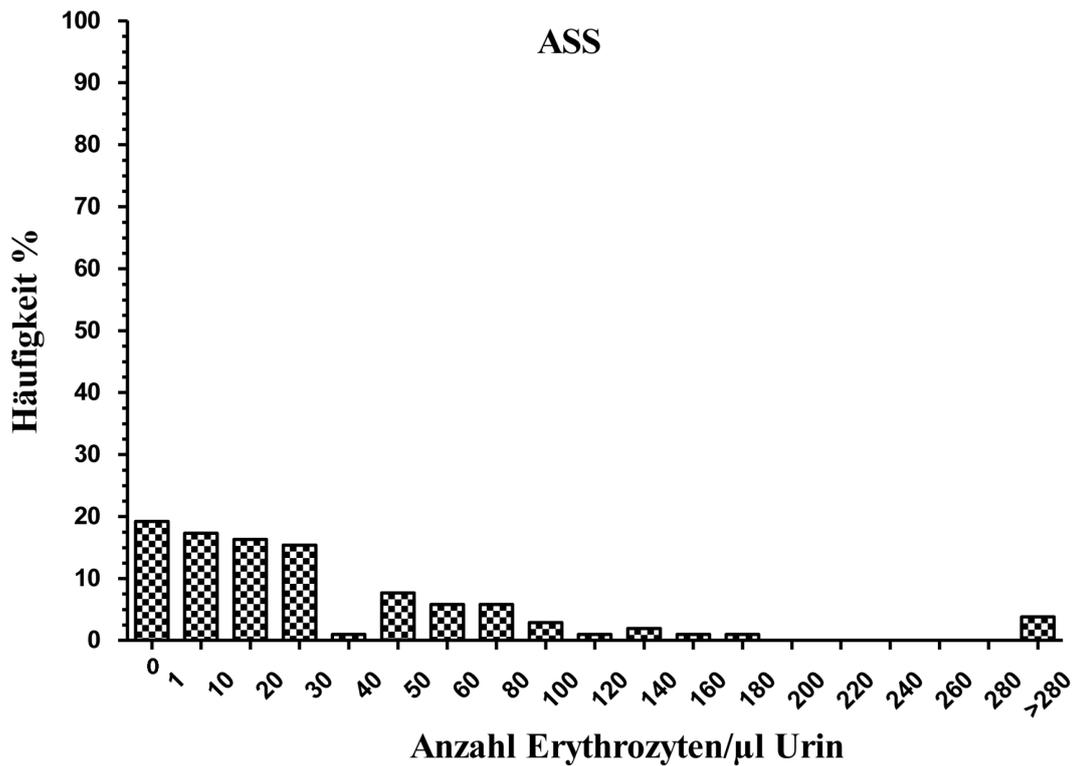


Abb. 4.2.3.: Häufigkeitsverteilung der Zellausscheidung unter ASS. Unter ASS ist die Zahl der Patienten ohne nennenswerte Zellausscheidung am geringsten von allen 3 Gruppen unter Antikoagulationstherapie. In den Klassen bis 60 Erys/µl lagen 70% der Befunde, bis 120 Erys/µl weitere 10%, bis 180 Erys/µl noch 4% und >280 Erys/µl noch einmal 4%.

4.2.4 Patienten unter Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel (Plavix®)

Während in den Gruppen unter Marcumar und ASS Therapie jeweils ca. 100 Patienten rekrutiert werden konnten, war die Patientengruppe mit der Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel (Plavix®) mit 51 Patienten deutlich kleiner, weil sie auch schwieriger zu rekrutieren war.

Tabelle 4.2.4.: Mittelwertstatistik der ASS & Plavix-Gruppe. Das mittlere Alter war vergleichbar mit den anderen Therapiegruppen ebenso wie S-Kreatinin, eGFR und die Ausscheidung von Protein (28 männliche, 23 weibliche Patienten, Altersspanne 17-85).

ASS & Plavix							
	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/ μ l	U-Protein	Besonder-
	Jahre	mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	67,6	1,02	72,4	7,0	69,6	11,4	11 x Bakterien
SEM	1,9	0,05	3,7	2,3	22,9	4,9	4 x Leukozyten
n	51	51	51	51	51	32	1 x Uratkristalle

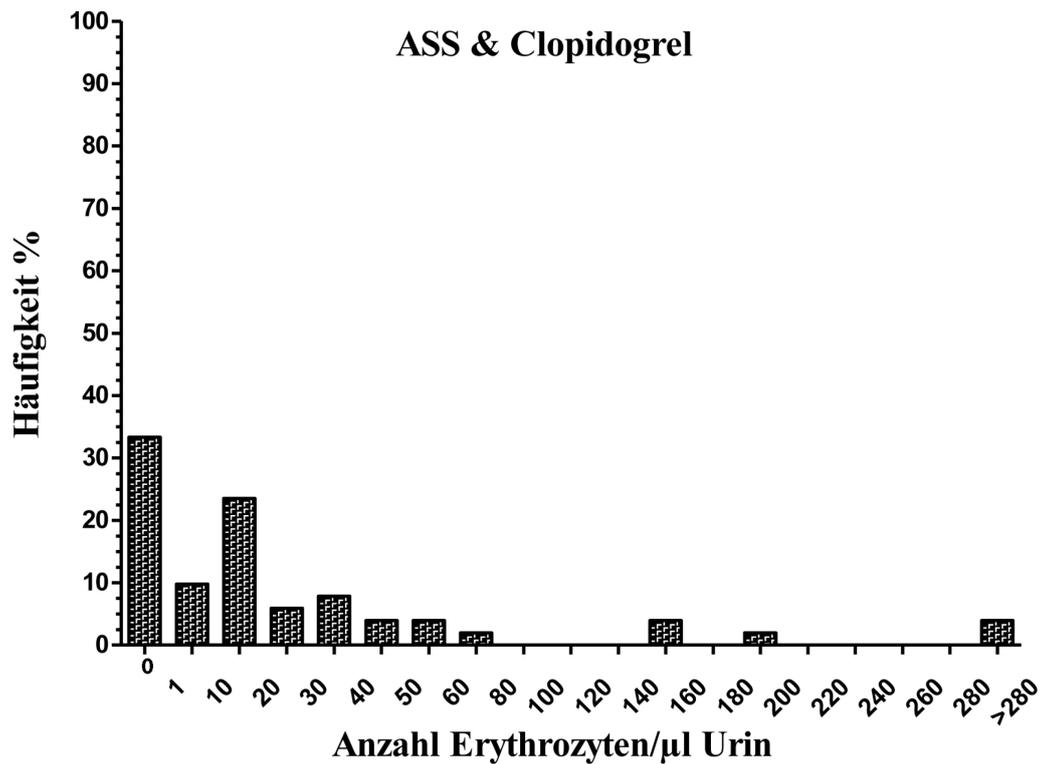


Abb. 4.2.4.: Häufigkeitsverteilung der Zellausscheidung unter ASS & Clopidogrel. Die Zahl der Patienten ohne nennenswerte Zellausscheidung lag mit 33% höher als unter ASS allein. Nimmt man die zweite Klasse von 1-10 Zellen/µl hinzu findet sich kein Unterschied. Bei 10% der Patienten lag die Zellzahl >140/µl.

4.2.5 Übersicht der Ergebnisse zur Hämaturie unter Antikoagulation

Der Vergleich der Mittelwerte im Grad der Hämaturie ist sehr deutlich, auch wenn es eine große Streubreite gibt. Da kann eine Häufigkeitsverteilung bei den einzelnen Therapiegruppen gegeneinander aufgetragen die Unterschiede besser verdeutlichen.

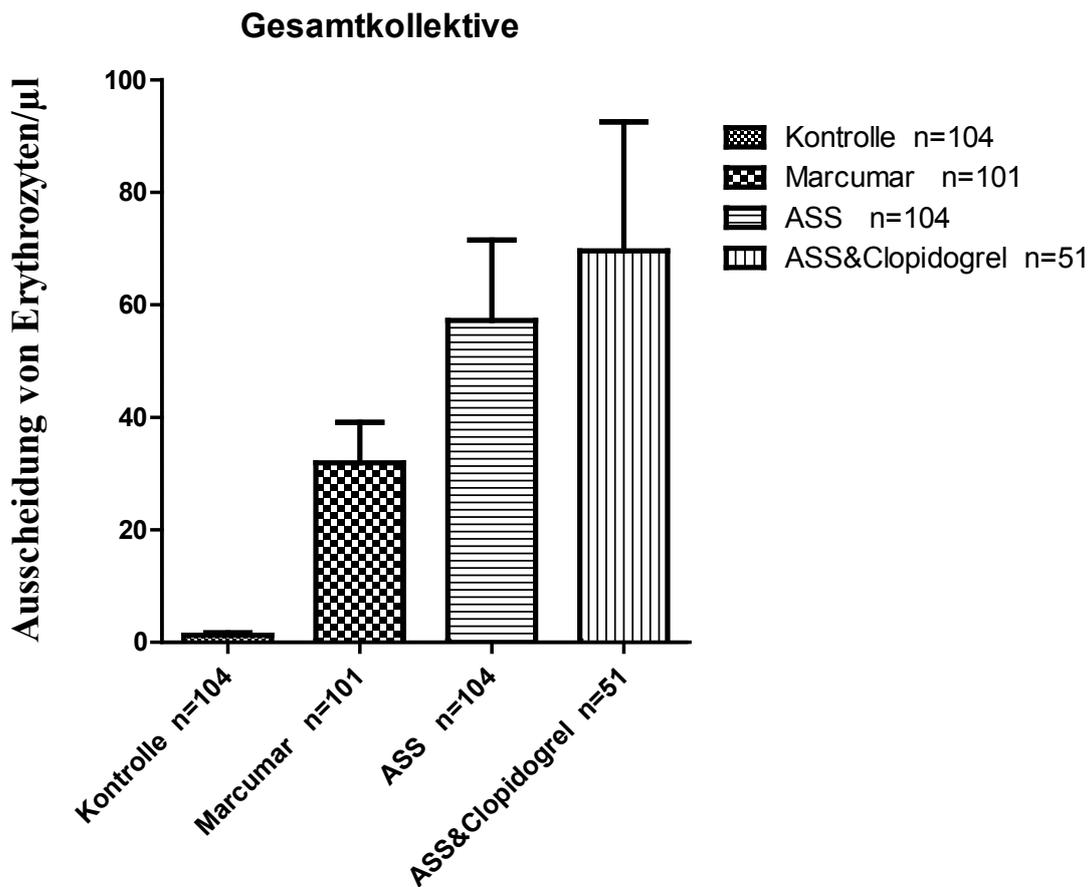


Abb. 4.2.5.: Grad der Mikrohämaturie der Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrolle. Gegenüber den Kontrollen zeigt sich der große Unterschied sehr deutlich, während die Unterschiede zwischen den Therapiegruppen untereinander wegen der großen Streubreite statistisch nicht zu sichern sind (MW±SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit der Anova Varianz Analyse (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) mit anschließendem Turkeys Test. ASS und ASS/Clopidogrel sind gegenüber der Kontrolle signifikant

($P < 0,05$), Marcumar erreicht dieses Signifikanzniveau nicht ganz. Details finden sich im Tabellarium.

Tabelle 4.2.5.: Mittelwertstatistik zur Abb. 4.2.5.

Kontrolle n=104			Marcumar n=101			ASS n=104			ASS & Plavix n=51		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
1,25	0,430	104	31,90	7,20	101	57,20	14,30	104	69,60	22,90	51

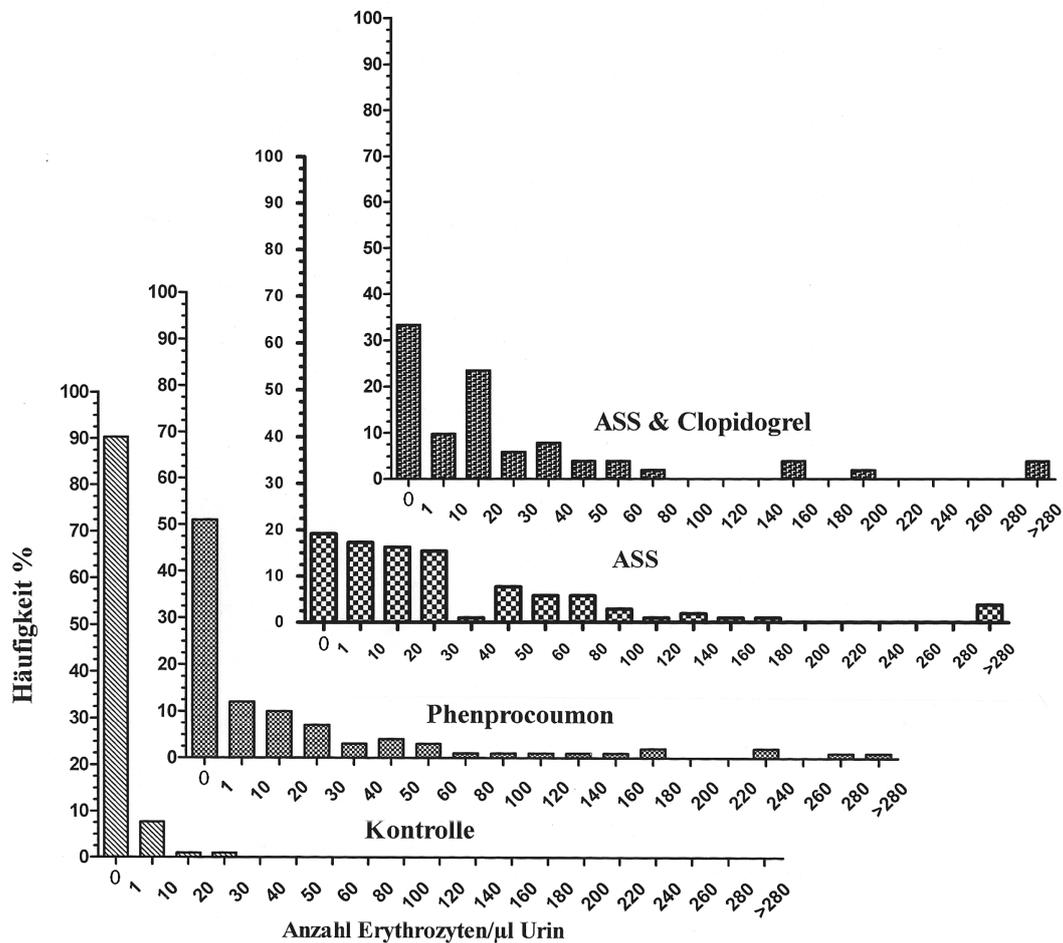


Abb. 4.2.6.: Gegenüberstellung der Häufigkeitsverteilung zwischen Therapiegruppen und Kontroll-Kollektiv. Während im Kontroll-Kollektiv 98% der Patienten weniger als 10 Erythrozyten/µl ausscheiden, sind es im

Marcumar-Kollektiv 63%, im ASS-Kollektiv 37% und im Kollektiv ASS plus Clopidogrel 43%.

Ein Ziel der Arbeit war es, weitere, auch klinische Gesichtspunkte zur Unterstützung der Arbeitshypothese zu erhalten, dass es Membranlücken in den glomerulären Kapillaren gibt, die unter physiologischen Bedingungen abgedichtet sind und unter pathophysiologischen Bedingungen demaskiert werden können und zu Proteinurie und Hämaturie beitragen. Das Ergebnis der selbst gesammelten und untersuchten klinischen Daten weist dem Gerinnungspotential eine wichtige Rolle zu, wie dies bereits früher vermutet wurde (3; 5; 17; 82; 95).

5 Diskussion

5.1 Zum experimentellen Modell

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenniere ist seit der Einführung 1959 (96) ein weltweit genutztes experimentelles Modell für physiologische, biochemische und pharmakologische Fragestellungen (46; 47; 64; 74; 79; 90). Eine Besonderheit an diesem Modell war die erhöhte Ausscheidung von Albumin im Vergleich zur in vivo Situation und dies war auch Anlass über die Ursachen dieser Proteinurie weitergehende experimentelle Untersuchungen anzustellen (73; 76; 77; 81; 88). Die Beobachtung, dass in der Frühphase nach Beginn der Perfusion auch bei zellfreiem Perfusat Erythrozyten in den ersten Urinproben sedimentierten hat zu einer ersten Analyse geführt und gezeigt, dass bei Zusatz von 5% Erythrozyten eine permanente Mikrohämaturie bestehen bleibt, die um ein Vielfaches höher liegt als in vivo (72). Ziel dieser Arbeit war es, die experimentelle Datenlage zu diesem Befund zu verbreitern für die daraus entwickelte Hypothese der reparierten Defekte der glomerulären Kapillarwand (72). Bereits vor der Formulierung dieser Hypothese hat Swanson (89) eine Arbeit vorgelegt, in der als Nebenbefund gezeigt wurde, dass ein Erythrozytenzusatz die Proteinurie begrenzt, die bei zellfreier Perfusion deutlich höher ist. Aus dieser Arbeit stammt die folgende Abbildung.

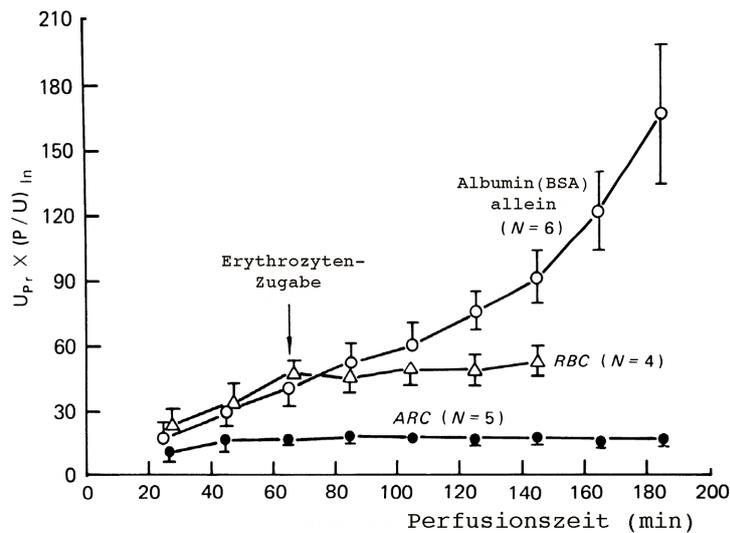


Abb. 5.1.1: Proteinurie an der isolierten und mit Albumin perfundierten Niere über die Versuchszeit. Das Diagramm ist modifiziert nach Swanson et al. (89). Es zeigt drei Protokolle: ARC = Perfusat mit Albumin und Erythrozytenzusatz von Beginn an mit den niedrigsten Werten. Mit zellfreier Perfusion und Albumin allein stetiger Anstieg der Proteinurie. RBC = zunächst zellfreie Perfusion mit Albumin (bovines Serum-Albumin), nach 60 min Erythrozyten-Zugabe. Werden nach 60 min Erythrozyten zugegeben, wird ein weiterer Anstieg der Proteinurie gebremst. Mit Erythrozyten ist die Proteinausscheidung konstant, wenn auch gegenüber in vivo erhöht. Ordinate: hochgerechnete Proteinkonzentration mg/dl im glomerulären Ultrafiltrat.

Ohne Erythrozyten kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Proteinurie, die mit Erythrozyten zwar auch deutlich erhöht ist aber im Zeitverlauf konstant bleibt. Auch wenn Erythrozyten erst nach 60min zeitverzögert addiert werden führt dies dazu, dass das Ausmaß der Proteinurie stagniert. Pagel konnte in seiner Dissertationsarbeit 1986 zeigen (55), dass die Albuminurie sich durch Erythrozytenzugabe halbiert und der Effekt noch grösser ist, wenn Albumin und Globulin als Proteine präsent sind (s.a. Abb. 1.5., S. 15). In der gleichen Arbeit, die später an anderer Stelle publiziert wurde (56), konnte die Kinetik der Proteinurie in der Initialphase der Perfusion durch eine osmotische Diurese

noch in der in vivo Phase sehr früh erfasst werden (s. Abb. 1.1., S 8). Dies zeigt, dass der Zeitverlauf im schnellen Anstieg der Albuminurie umgekehrt proportional zum raschen Abfall der Erythrozyturie in der Initialphase der Perfusion gesehen werden kann. Das kann man so interpretieren, dass es mit dem Auswaschen von Erythrozyten zur Demaskierung von größeren Membrandefekten der glomerulären Kapillaren kommt. Fügt man jedoch Erythrozyten zum Perfusat hinzu, können diese durch die herausgewaschenen Erythrozyten entstandenen Membrandefekte durch nachfolgende Erythrozyten wieder geschlossen werden und stehen damit für die Proteinpassage nicht mehr zur Verfügung.

Aus Mikropunktanalysen war bekannt, dass nur ein Anteil von 16% der Glomeruli eine sehr hohe Permeabilität aufweist (81; 91). Die verbliebene, aber erhöhte Albuminurie könnte darauf zurückzuführen sein, dass die vermutlich kleineren Defekte in vivo durch andere Reparaturmechanismen, die aus dem Vollblut geschöpft werden, abgedichtet werden können. Haraldsson hat hierfür weitere Prinzipien zur Diskussion gestellt. Zum einen hat er Hinweise dafür erarbeitet, dass bereits in Höhe der Endothelfenster der glomerulären Kapillaren eine funktionell wirksame Barriere aufgebaut wird, die unter in vivo Bedingungen durch hämodynamische Veränderungen gestört wird und unter in vitro Perfusion abgewaschen wird (28). Zudem hat er gezeigt, dass ein Serumprotein wie Orosomuroid die Permeabilität für Albumin reduziert (29).

65

Eine ganze Reihe anderer Komponenten aus dem Vollblut kommt dafür auch noch in Frage wie Thrombozyten, Fibronectin, Fibrin und Fibrinogen, und andere Gerinnungsfaktoren wie Faktor VIII, wie es durch die Arbeit von Serneri eindrucksvoll beschrieben worden ist (82).

Durch eine Arbeit von Jai-Trung (39) hat man eine Vorstellung davon, wie groß Lücken sein müssen, um für Erythrozyten mit einem Durchmesser von 7 μm passierbar zu sein.

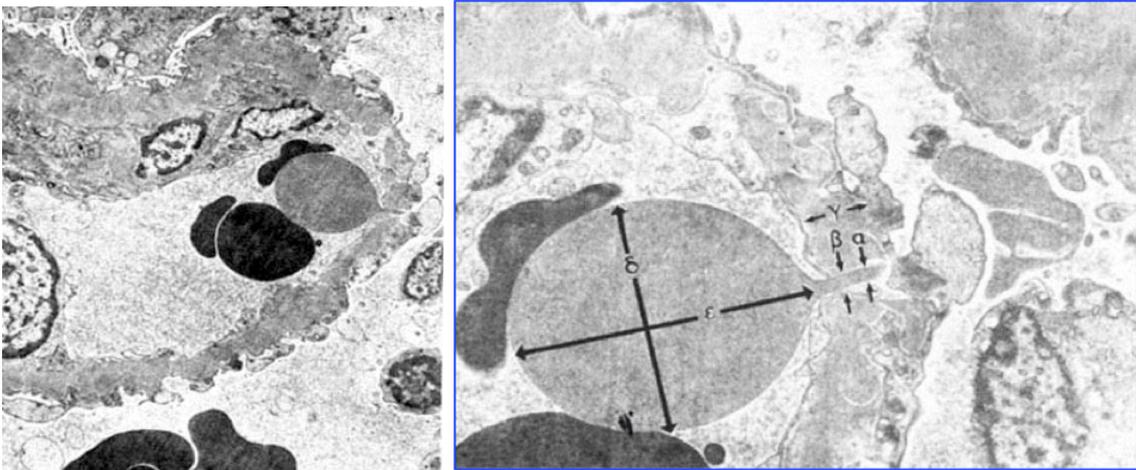
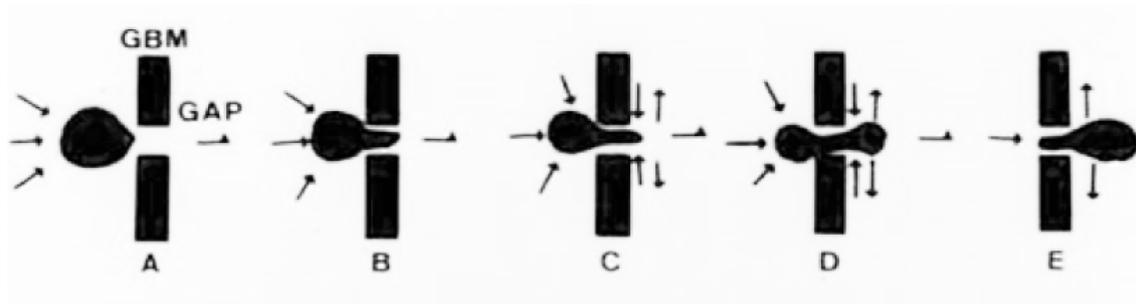


Abb. 5.1.2. Erythrozytenpassage durch eine GBM-Lücke. Die Aufnahmen sind der Arbeit von Jai-Trung (39) entnommen und zeigen, dass eine Lücke (gap) von 200nm ausreicht um dem extrem verformbaren Erythrozyten (7 μm) die Passage zu ermöglichen; dazu ein Sketch aus dieser Arbeit:



In einer älteren Arbeit von Stejskal (85) sind auch Hinweise für Membranlücken der glomerulären Kapillaren bei glomerulären Erkrankungen aufgezeigt. Eine weitere Übersicht findet sich bei Makino (48). Die Arbeitsgruppe von Bohle hat sogar Fälle von Makrohämaturie bei einer milden mesangioproliferativen Glomerulonephritis ohne Halbmonde beschrieben und in aufwendigen Serienschritten die Basalmembranaufbrüche dokumentiert (12). In einem Editorial (44) hat Wilhelm Kriz eine Arbeit von Ichimura (38) aus der Arbeitsgruppe von Sakai diskutiert, wonach ein Diaphragma die Endothelfenster in der Embryonalentwicklung noch auskleidet, aber im späteren Alter verlorenght zu Gunsten einer höheren Filtrationsleistung und über die schon bei Haraldson diskutierte funktionell wirksame Endothelauskleidung, die auch von Rostgaard beschrieben wurde (65), und die in der folgenden Abb. skizziert ist.

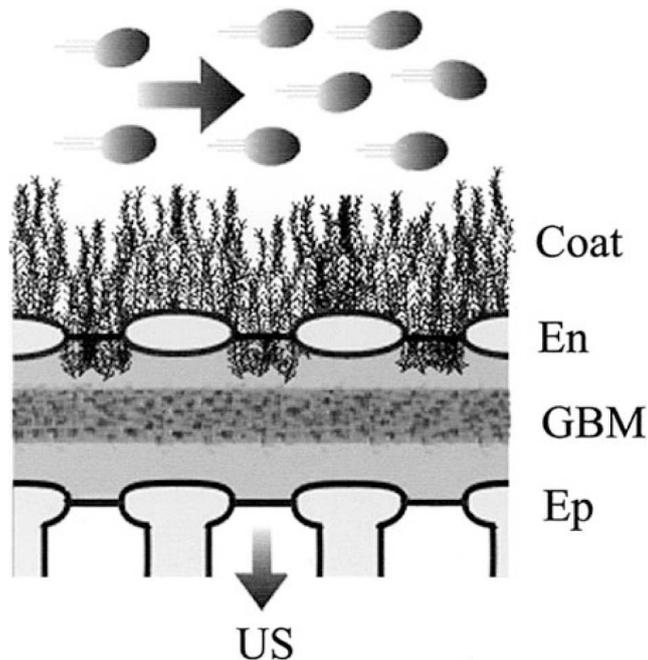


Abb. 5.1.3.: Schematisches Bild der versiegelten Endothelfenster.

Rostgaard und Qvortrup nennen die Versiegelung der Endothelfenster „sieve plug“ und schreiben ihr die Funktion einer Frontbarriere zu. Es bedurfte sehr spezieller Fixierungstechniken um die Existenz der Auskleidung dieser Endothelfenster nachzuweisen (65).

In welcher Weise diese „sieve plugs“ Einfluss auf die Trennung zwischen Molekülen nehmen, die passieren und solchen, deren Passage behindert wird, ist eine interessante Frage, die auch schon vor der Beschreibung dieser funktionellen Auskleidung der Endothelfenster diskutiert wurde. Ryan und Karnovsky haben in einer Arbeit von 1976 gezeigt, dass es bei einer hämodynamischen Störung mit reduziertem Plasmastrom zum Eindringen von Proteinen in die Kapillarwand kommt, die dort sonst nicht anzutreffen sind (67). Wie komplex man sich diese Fensterauskleidung vorstellt, zeigt die nächste Abbildung.

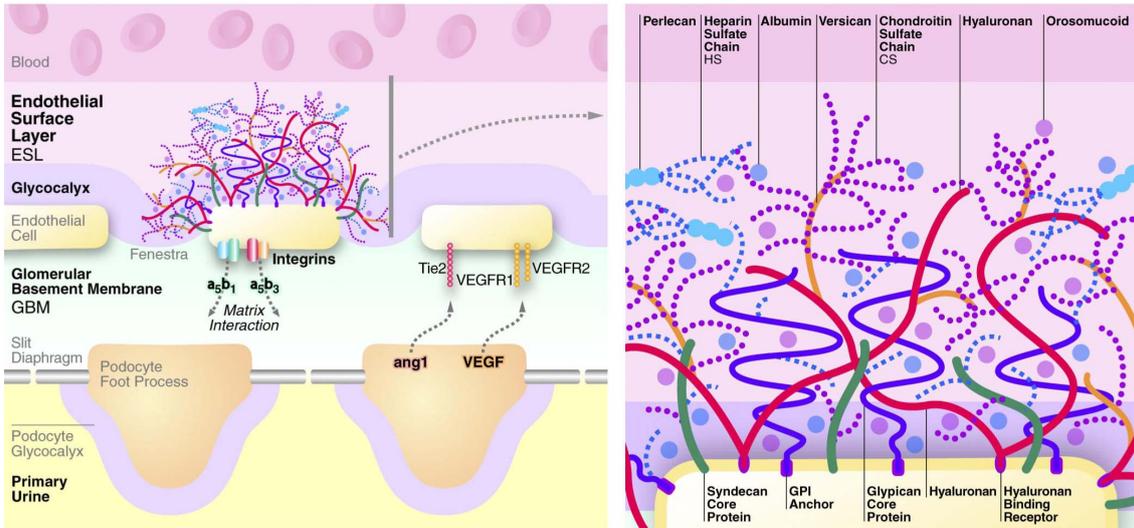


Abb. 5.1.4.: Schematische Darstellung und Zusammensetzung der Auskleidung der Endothelfenster. Diese Abbildung ist der Arbeit von Haraldsson entnommen und gibt mehr Details wieder über Substanzen, die den „sieve plug“ bilden können. Dabei ist z.B. das Orosomucoid eine Substanz, die als nicht gewollte Verunreinigung in einem Humanalbumin-Präparat zur Entdeckung seiner Abdichtfunktion geführt hatte (28; 29).

Es gibt zwei weitere Gesichtspunkte, die für diese Hypothese ins Feld geführt werden können. Bei der Testung von Hohlfasern für die Hämodialyse wird in aller Regel verdünntes Vollblut genutzt, weil es viel besser als eine z.B. reine Albuminlösung die reale Permeabilität unter in vivo Bedingungen abbildet. Eine reine Albuminlösung würde eine solche Membran wegen einer viel zu hohen Durchlässigkeit für Proteine in der Größe des Albumins disqualifizieren. Erst der Vollblutkontakt schafft die wirksame und ausreichend dichte Barriere wie Röckel zeigen konnte (62). Eine Polysulfonmembran mit einer Ausschlussgrenze von 66.000 Dalton hat schon nach 20-30 min Vollblutkontakt diese Grenze in den Bereich von 30.000 Dalton verschoben, sodass sie sich für Albumin praktisch abgedichtet hat.

Ein weiterer Gesichtspunkt wurde von Stefanidis (83; 84) diskutiert. Wird eine menschliche Niere transplantiert, ist sie zuvor mit zellfreien Konservierungs-

lösungen von Blutbestandteilen freigespült worden. Misst man unmittelbar nach Anschluss dieser Niere Protein im frisch ausgeschiedenen Urin findet man sehr große Eiweißmengen in nephrotischem Ausmaß, die innerhalb von 24h fast in den Normalbereich zurückgehen. Die Interpretation dieses Befundes wird von den Autoren auf den Verlust von geladenen Molekülen wie Proteoglykanen u.a. Heparansulfat zurückgeführt. Dabei ist nicht klar, ob es z.B. der Verlust der „sieve plugs“ durch das Freispülen von Blut zur Konservierung ist. Dafür könnte sprechen, dass „sieve plugs“ bei der herkömmlichen Perfusionsfixierung nicht darstellbar sind, sondern spezieller Verfahren zur Darstellung bedürfen. Man kann dies auch als den Effekt interpretieren, den Vollblut ausübt, wenn es die demaskierten Membrandefekte wieder abdichtet, die durch das Freispülen bei der Konservierung demaskiert worden waren. Auch verschiedene Formen der funktionellen Proteinurie ließen sich so erklären.

Unter hämodynamischen Veränderungen erhöht sich die Proteindurchlässigkeit. Dies wurde experimentell von Ryan und Karnovsky diskutiert (67) und ist durch den Einfluss von Angiotensin II belegt (18) wobei ein Gesichtspunkt erwähnenswert erscheint: die an der zellfrei perfundierten Niere erhöhte Albuminurie wird unter dem Einfluss von Angiotensin II nicht weiter erhöht, wie Thole in seiner Dissertation zeigen konnte (72; 91). Daraus kann man schließen, dass es unter dem Einfluss von Angiotensin II zur Demaskierung von Defekten kommen kann, die sich auch wieder verschließen, also nur passager funktionell wirksam sind. Dieser Effekt kann durch ACE-Hemmer blockiert werden. In diese Gruppe gehören auch die Proteinurie bei Herzinsuffizienz unter Katecholaminexzess (15; 23), bei erhöhtem renal venösem Druck (88), die orthostatische Proteinurie (71) und die Proteinurie bei Fieber (11; 31), die alle der sogenannten unselektiven Proteinurieform zuzuordnen sind (11; 71; 76; 77; 81). Erst kürzlich ist eine Arbeit aus der Physiologie in Regensburg erschienen, die mit neuer Technologie, einer Multiphotonen-Mikroskopie die Zunahme der Albuminurie in vivo unter Angiotensineinfluß (18) eindrucksvoll bestätigt hat (70). Die Heterogenität der Nephrone wie sie Eisenbach (18) bei Mikropunktionsexperimenten in vivo unter Angiotensin II gefunden hat, sind ein

Äquivalent zu der Heterogenität von Mikropunktionsproben an der isoliert perfundierten Niere, bei der 16% der Proben deutlich mehr Protein enthielten als das Restkollektiv (72; 76; 77; 81).

Yoshioka hat in einer Arbeit 1986 den Effekt einer Venendruckerhöhung beschrieben (101), die dazu führt, dass der glomeruläre Plasmastrom abnimmt, der Widerstand im Vas efferens und damit auch die glomeruläre trans-kapilläre Druckdifferenz zunimmt. Damit war eine Erhöhung der Proteinurie verbunden, wie sie an der IPRK schon 1977 beschrieben worden war (86; 87). Durch den Angiotensin II Antagonisten Saralasin war der Effekt trotz weiterbestehender Venendruckerhöhung aufzuheben. Das Manöver der Venendruckerhöhung führte zu einer Zunahme der Permeabilität für größere neutrale Dextrane, nicht aber für kleinere Dextranmoleküle. Vergleichbare Veränderungen beschrieb Bohrer bei Ratten in Narkose unter der Zuinfusion von Angiotensin II (13). Das entspricht der Veränderung zu einer höheren Durchlässigkeit für größere Makromoleküle, d.h. zu einer „unselektiven“ Proteinurie.

5.2 Zu den experimentellen Befunden

Das eingesetzte Modell der isoliert perfundierten Niere vermeidet eine ischämische Phase im Übergang zwischen der *in vivo* Perfusion und der *ex vivo* (*in vitro*) Perfusion. In der Übergangsphase ist die Perfusionskanüle in die distale Aorta caudal der Aortenklemme eingebunden. Zeitgleich mit dem Abbinden der proximalen Aortenligatur wird die Aortenklemme geöffnet, die Perfusion gestartet und die Niere blasst sofort ab und nimmt ihre Eigenfarbe an, sodass das Blut momentan komplett aus dem Gefäßbett ausgewaschen wird. Umso erstaunlicher waren die ersten Befunde die darauf hinwiesen, dass sich Erythrozyten im Urin-Sediment fanden. Die ersten systematischen Befunde stammen aus dem Labor in Hannover und wurden 1986 auf dem Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in Frankfurt vorgestellt (72). Damals war die Datenbasis der daraus abgeleiteten Hypothese der „repaired defects“ in

Hinblick auf die erhöhte Proteinurie schon ausreichend aber in Bezug auf die Hämaturie mit 6 Versuchen noch recht gering.

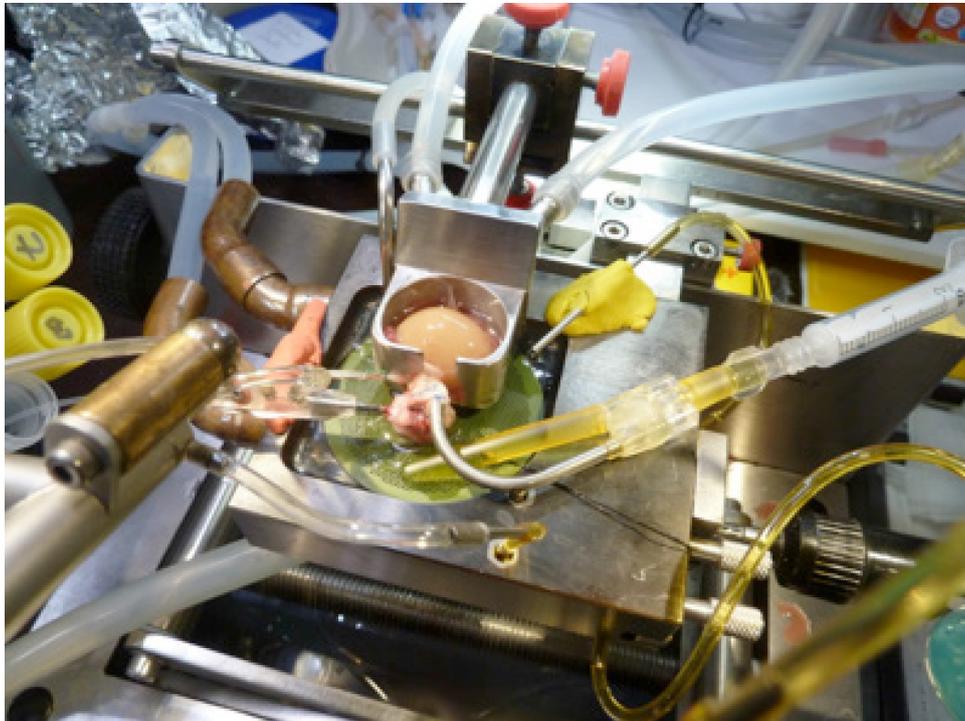


Abb. 5.2.1.: Experimenteller Aufbau mit zellfrei perfundierter Niere. Die Parafilmabdeckung ist entfernt, damit die Eigenfarbe der abgeblassten Niere besser sichtbar wird. Die Niere liegt in der wasserbadtemperierten Schale, der darunter liegende Block ist ebenso temperiert. Die gebogene Kanüle leitet das venöse Effluat ab. Links vor der Niere die doppeläufige Perfusionskanüle in Aortenposition und knapp darüber der Ureterkatheter, der links zu einem Sammelgefäß führt.

Die Abb. 5.2.2. zeigt die damaligen Daten graphisch im log Maßstab aufgetragen. Die in den letzten Jahren im Labor in Münster durchgeführten Experimente haben diese Befunde im Wesentlichen bestätigen können. Bei der zellfreien Perfusion im single pass Modus ohne Kolloid ist die Ausscheidung von Erythrozyten noch schneller beendet (Abb. 4.1.1.), die Kurve weiter links versetzt gegenüber der Abb. 5.2.2. und auch gegenüber den neuen Experimenten mit Rezirkulations-/Dialysetechnik der Abb. 4.1.2. Das hängt mit

den sehr hohen Urinflussraten zusammen, die im single pass Modus ohne Kolloid mehr als 50% der hohen GFR erreichen und rund um Faktor 4-5 höher liegen als mit Albumin als Kolloid. Im Unterschied zur Rezirkulationstechnik war es beim single pass Modus technisch möglich, sehr früh nach Perfusionsbeginn (Sammelperiode 2. - 5. Minute) eine erste Urinprobe zu gewinnen, zum einen wegen der hohen Urinflussraten und zudem wegen der einfacheren Technik. Die hohe Zahl an Erythrozyten hat überrascht, wenn man vor Augen hat, dass eine Rattenniere im Mittel „nur“ ca. 30.000 Glomeruli bzw. Nephrone hat und die Quelle der Erythrozyten mutmaßlich die glomerulären Kapillaren sind, die ihre „deponierten“ Erythrozyten via Harnkanälchensystem, Nierenbecken und am Ende via Ureter abgeben.

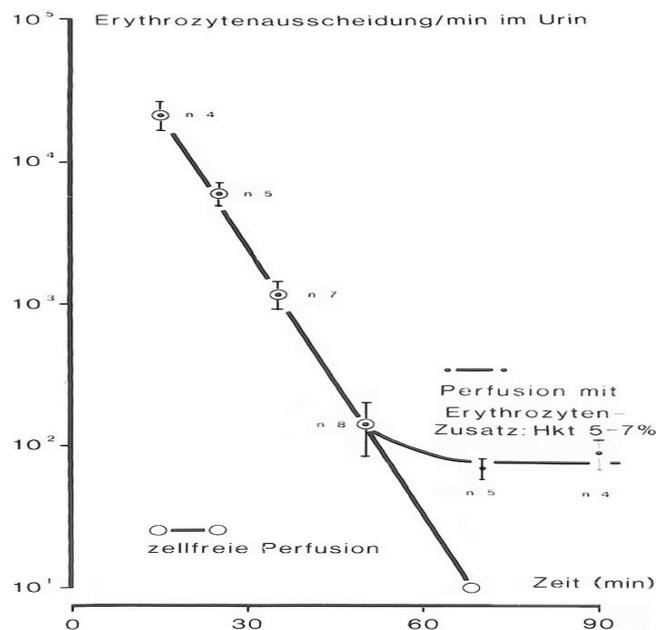


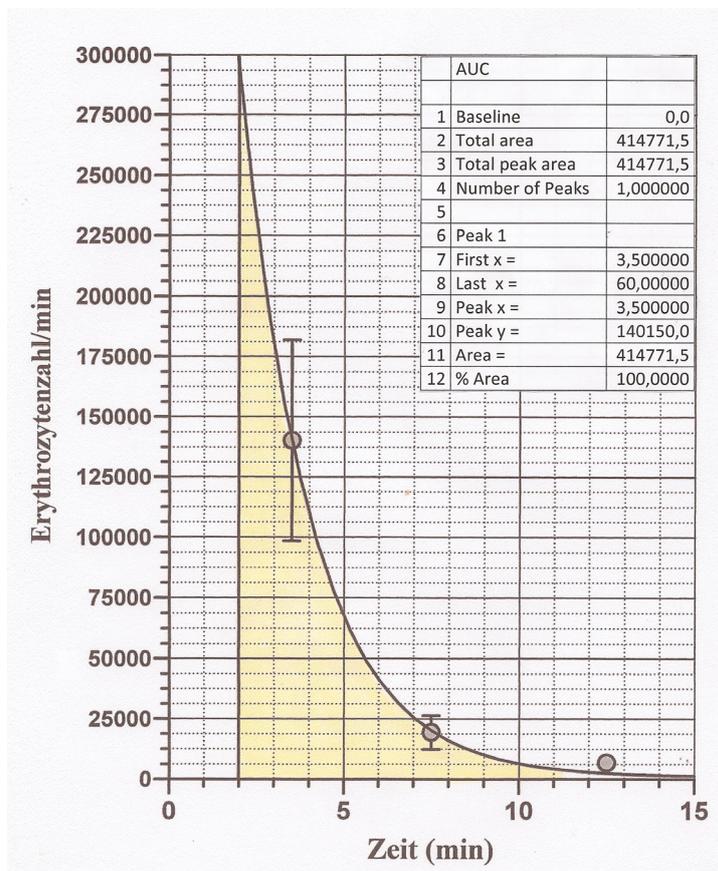
Abb. 5.2.2.: Historische Daten von 1986 mit dem Zeitgang der Ausscheidung von Erythrozyten im Urin der IPRK. Perfusion im Rezirkulations/Dialysemodus mit 5 g% BSA ohne und mit 5% Humanerythrozyten. Durch die halblogarithmische Darstellung ergibt sich eine Gerade für die zellfreie Perfusion. Mit Zusatz der Erythrozyten kommt es zu

dem Plateau der Hämaturie nach 60 min mit ca. 100 Erythrozyten pro Minute im Urin (72; 77; 81).

Von den drei experimentellen Gruppen, single pass Modus, Rezirkulation mit BSA und Rezirkulation mit BSA und 5% Erythrozytenzusatz war der single pass Modus mit der höchsten GFR und dem höchsten Urinzeitvolumen diejenige Gruppe mit dem schnellsten Abfall der Zellausscheidung (s. Abb. 4.1.1 – 4.1.3.). Daraus entstand die Vorstellung, aus der Kinetik dieses Abfalls die Gesamtzahl der in der Übergangphase ausgeschiedenen Erythrozyten hochzurechnen. Zudem war es die experimentelle Gruppe, bei der man bei einfacheren technischen Bedingungen am frühesten Urin über einen so kurzen Zeitraum wie von der 2 bis zur 5 Minute sammeln konnte. Deshalb bot es sich an, aus einer linearen Auftragung über eine e-Funktionskurve die gesamte ausgeschiedene Zellzahl hochzurechnen, um eine Vorstellung davon zu erhalten, wie viele Erythrozyten aus den glomerulären Kapillaren via Harnkanälchen im Endurin auftauchen. Ein weiterer Vorteil des single pass Modus in diesem Zusammenhang ist es, dass sofort nach Perfusionsbeginn auf druckkonstanten Perfusionsmodus umgeschaltet werden kann, weil ausreichend Perfusat zur Verfügung steht. Beim Einsatz von BSA/BSA plus Erythrozyten muss man über mehrere Minuten bis zum Schließen des Rezirkulations-Kreislaufs flusskonstant perfundieren, um nicht zu viel wertvolle Albuminlösung / Erythrozyten zu verlieren.

Abb. 5.2.3.: Zeitgang der Erythrozytenzahl pro Minute im Urin nach Beginn der Perfusion. Zur besseren Übersicht sind nur die ersten 15 Min. dargestellt. Die zeitlich frühest mögliche Urinsammelperiode lag zwischen der 2 und 5 Minute nach Beginn der Perfusion. Aus den nachfolgenden Proben wurde eine Funktionskurve generiert, die extrapoliert auf die 2. Minute die 300.000 Marke erreicht. Die gelb markierte Fläche – AUC – (area under the curve) entspricht der integrierten ausgeschiedenen Zellzahl. Die mit GraphPad berechnete Fläche startet ab Minute 3,5, dem Mittelwert der Sammelperiode von der 2. bis zur 5. Minute. Die AUC zwischen Minute 2 und 3,5 kann man leicht addieren: $415.000 + 315.000 = 730.000$.

Rechnet man aus der Abb. 5.2.3. die Zellzahl der gelben Fläche unterhalb der Kurve aus zwischen der 2. und der 15. Minute, kommt man auf ca. 730.000 Erythrozyten, umgerechnet über 30.000 Glomeruli pro Niere kommt man auf 24 Erythrozyten pro Nephron, die via glomeruläre Kapillaren über das Harnkanälchensystem in den Endurin gelangen. Die Fläche ab der 3,5. Minute ergibt 415.000 rote Blutzellen, das wären 14 Erythrozyten pro Glomerulus (s.



Originalberechnung). Das sind vorstellbare Grössenordnungen. Adalbert Bohle hat in seiner Arbeit (12) nachvollziehbar gezeigt, dass schon geringe und allfällig auftretende entzündliche und passagere Prozesse zu kleinen Läsionen in der glomerulären Basalmembran führen können, welche sogar zu einer Makrohämaturie führen können, wenn es zu einer Kapillarruptur kommt.

Von einer Kapillarruptur ist man bei diesen Zahlen weit entfernt. Man muss sich vor Augen führen, dass glomeruläre Kapillaren einer hydraulischen Druckdifferenz ausgesetzt sind, die höher als in jedem anderen Kapillarnetz ist. Jeder Kliniker weiß, dass eine Gerinnungsstörung wie z.B. eine Thrombopenie sichtbare petechiale Blutungen in der Haut hervorrufen, nur da sie direkt sichtbar sind. Die eingesetzte Perfusionslösung hat keinerlei Gerinnungskomponenten, die ja unter in vivo Bedingungen für Reparaturprozesse eingesetzt werden können. Dann kann eine leichte Läsion der Basalmembran schnell einmal den besagten 200 nm messenden Defekt aufweisen, der zur Penetration von roten Blutzellen unter Verformung ausreicht. Vorstellbar wäre, dass beim Auswaschprozess des Vollbluts aus dem Gefäßbett Verzögerungen im Kapillarbereich entstehen, die auch Quelle werden können für eine verspätete glomeruläre Penetration. Man kann auch nicht vollständig ausschließen, dass Nierenbecken und Ureter eine Quelle für zurückgebliebene Erythrozyten sind. Dies würde aber nicht weiterhelfen die Befunde zu erklären, dass Erythrozyten die erhöhte Albuminausscheidung an der isolierten Niere reduzieren und im Verlauf auf einem Niveau stabilisieren (s. Abb. 1.5. und 5.1.1.). In der Abb. 4.1.5. ist ein Beispiel mit Einblutung in das Nierenbecken gezeigt, das in diesem Fall die Quelle für eine Hämaturie war, die Zehnerpotenzen höher lag und bis in die 3 Stunde andauerte. Dies war mit ein Grund, die Nieren am Ende der Perfusion systematisch sagittal aufzuschneiden und im Zweifel unter dem Aufsichtsmikroskop anzusehen.

Bei den Experimenten mit Rezirkulation und BSA (ohne und mit Erythrozyten) sind auf Grund der geringeren Urinzeitvolumina und der komplizierteren Technik bis zum Schließen des Kreislaufs die ersten Proben deutlich später zu gewinnen gewesen.

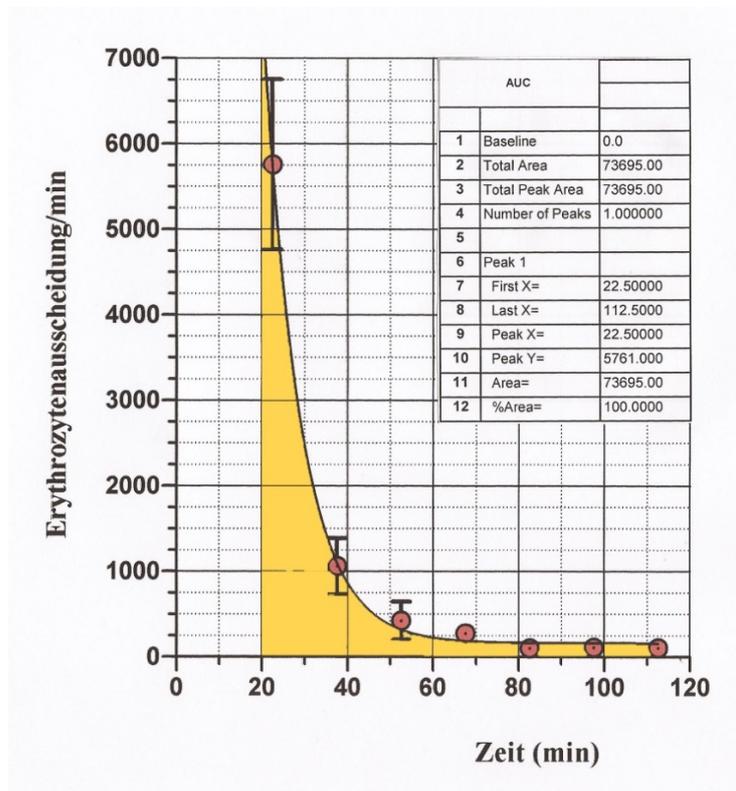


Abb. 5.2.4.: Zeitgang der Erythrozytenzahl im Urin bei Perfusions-Modus Re-zirkulation / Dialyse mit BSA und 5% Erythrozyten. Bei 22,5 min ist die Mitte des ersten Messpunkts. Die AUC Berechnung ergibt dann nur noch rund 74.000 Zellen, ein Zehntel dessen, was bei früher Sammlung im single pass Modus zu erfassen war, wie bei der vorigen Abb. 5.2.3. Danach ist aber die verbleibende Zellausscheidung bis in die 2 Stunde mit ca. 100 Erythrozyten/min vom 5% Erythrozytenzusatz gespeist. Die gelbe Fläche (22-112,5 min) ist etwas größer als die berechnete AUC, die von 22,5 min bis 112,5 min reicht.

Bislang wurde nicht ausreichend untersucht die Frage, ob eine pulsatile Perfusion Änderungen in der Permeation von Erythrozyten durch glomeruläre Kapillaren bewirken kann. Bei den letzten sechs der mit BSA und Erythrozytenzusatz im Labor in Münster perfundierten Nieren war im Unterschied zu früheren Experimenten der Windkessel ausgeklemmt worden, sodass pulsatile Druckschwankungen von 20-30 mmHg um einen mittleren Perfusionsdruck von 100 mmHg entstanden. Bei drei dieser Experimente war die Zahl der ausgeschiedenen Erythrozyten im Bereich der historischen Daten, die anderen drei Experimente zeigten deutlich höhere Zellzahlen, sodass sie nicht in die Auswertung kamen wie auch die bereits erwähnten allerersten

Experimente mit einer anderen Albumin Charge und ungewöhnlich niedrigen Filtrationsraten. Aus der Literatur sind Arbeiten aus der Kieler Arbeitsgruppe von Christoph Weiss bekannt (6), die Frequenzanalysen bei sinusförmigen Pulsationen ohne Bezug zu dem angesprochenen Problem untersucht haben. Rainer Nobiling in Heidelberg hat eine Arbeit publiziert, welche zeigt, dass bei zellfreier Perfusion in Phasen mit aufgezwungener Pulsatilität weniger Renin im venösen Effluat erscheint (52). Daraus könnte man ableiten, dass Pulsatilität eine Bedeutung haben könnte. Anzustreben wäre es, dieser Frage noch einmal systematisch einschließlich einer Analyse der Proteinurie und einer Mikrohämaturie bei Erythrozytenzugabe zum Perfusat unter Bedingungen einer gut definierten und aufgezwungenen Pulsatilität nachzugehen.

Ergänzung zur Diskussion Proteinurie

Als separates Beispiel der „repaired-defect“-Hypothese sowie der abdichtenden Funktion des Vollblutes möchte man an dieser Stelle auf folgende Beobachtung bzw. Verfahren hinweisen: Bei der Untersuchung künstlicher Membranen auf ihre Proteindurchlässigkeit für die Dialyse oder Hämofiltration wird traditionell Vollblut als Testlösung verwendet. Nur unter diesen Bedingungen kann sich zeitabhängig eine funktionelle Barriere entwickeln, wie sie auch unter in vivo Bedingungen besteht indem Leckagen abgedichtet werden, wie eine klinische Untersuchung an der Dialysebehandlung gezeigt hat (62). Dagegen ist z.B. die Albuminpermeabilität bei Verwendung einer Testlösung ausschließlich mit Albumin sehr hoch im Vergleich zum Vollblut (77). Der Vorteil von Vollblut gegenüber einer einfachen Eiweißtestlösung ist seine Eigenschaft die Leckagen mit Gerinnungsfaktoren, Serumeiweiß wie Orosomucoid (29), Gewebeklebern wie Fibronectin, und zellulären Elementen (72; 77; 81) wie Thrombozyten abzudichten.

Zu ähnlichen Überlegungen ist man durch Untersuchungen mit der kontinuierlichen Hämofiltration (CVVH) als Methode zur Behandlung des akuten Nierenversagens gekommen. Im Gegensatz zur intermittierenden Hämodialysebehandlung ist das Blut des Patienten hierbei mit der Membran

des Hämofilters mehrere Tage in Kontakt. Bei der Untersuchung der Permeabilität von Wasser und gelösten Substanzen im Bereich des Molekulargewichts von 10.000 bis 70.000 in-vivo während der gesamten Funktionszeit der Hämofilter wurde gezeigt, dass die hydraulische Permeabilität bei allen Filtern kontinuierlich abnimmt und ein linearer Anstieg des Transmembrandrucks notwendig ist, um die Filtrationsrate konstant zu halten. Dieser Effekt der kontinuierlichen Abnahme der hydraulischen Permeabilität ist stärker ausgeprägt bei den Filtern mit höherer Filtrationsrate pro Membranfläche und negativer Ladung der Membran. Die Laufzeit der Hämofilter stand in einem reziproken Verhältnis zur Filtrationsrate pro Membranfläche. Der Abfall der hydraulischen Permeabilität der Hämofilter wurde als Folge einer Sekundärmembranbildung durch die Vollblutkomponenten (Gerinnungsfaktoren, Serumproteine inkl. Makromoleküle, Gewebekleber wie Fibronectin und zelluläre Elemente) angesehen (99; 100). Während bei der maschinell betriebenen Hämofiltration die Filterleistung wie oben beschrieben abnimmt, ist diese wesentlich stabiler bei der spontanen kontinuierlichen Filtration (CAVH), die nur vom Blutdruck des Patienten getrieben wird und eine niedrigere Filtrationsfraktion als bei der pumpengetriebenen CVVH aufweist. Daraus kann man schließen, dass die Bildung einer Sekundärmembran mit Reduktion der hydraulischen Permeabilität nur bei einer zu hohen Filtrationsfraktion (>10% des Blutflusses) entsteht, nicht aber bei Verhältnissen, die der in vivo Niere nahekommen (69), also bei einer auf das Plasma bezogenen Filtrationsfraktion von <20%. Da ist das Modell der zellfrei isoliert perfundierten Niere mit einer Filtrationsfraktion von 1,5 bis maximal 8% (bei kolloidfreiem Perfusat am höchsten) noch deutlich günstiger.

5.3 Der Bezug zu klinischen Phänomenen

5.3.1 Proteinurie und funktionelle Proteinurie

Die Besonderheit glomerulärer Kapillaren in der Niere sind ihre hohe Durchlässigkeit für Plasmawasser und ihre geringe Durchlässigkeit für Plasmaeiweißkörper. Wenn man von Größenselektivität spricht, meint man, dass Peptide wie z.B. Peptidhormone und niedermolekulare Eiweißkörper mehr oder weniger behindert passieren können, während größere Eiweißkörper wie Albumin und Globuline weitgehend zurückgehalten werden. Dabei spielt die Ladungsselektivität eine große Rolle. Durch ihre negative Oberflächenladung bei physiologischem pH von 7,4 werden Serumeiweiße wie Albumin und Globuline zwar durch Abstoßungskräfte gut in Lösung gehalten, durch die ebenfalls negativen Ladungsgitter der glomerulären Filtrationsbarriere aber abgestoßen und somit zurück gehalten (25; 81). Im Gegensatz dazu kann eine Rarefizierung des negativen Ladungsgitters im Rahmen von Glomerulonephritiden zu einer deutlichen Erhöhung der Permeabilität für Plasmaproteine führen (77; 88). Ein besonderes Beispiel für eine sogenannte selektive Proteinurie ist die Minimal-Change-Glomerulopathie. Durch den Verlust der Ladungsselektivität entsteht eine reine Albuminurie: man spricht von einer selektiven Proteinurie. Unter normalen Bedingungen werden nur etwa 1-2 g Albumin pro 24 h glomerulär filtriert, im Endurin werden aber nur 20-40 mg Albumin ausgeschieden, weil im proximalen Tubulus die restliche Menge resorbiert wird. Der Rest an Urineiweiß sind sekretorische Proteine wie IgG und das Tamm-Horsefall-Mukoprotein. Bei der Minimal-Change-Glomerulopathie werden wesentlich größere Mengen an Albumin filtriert, sodass der proximale Tubulus schnell seine Resorptionskapazität erreicht und Albumin in relevanten Mengen im Endurin erscheint.

Im Unterschied hierzu sind funktionelle Proteinurien unselektiv. Man findet im Endurin neben Albumin auch Globuline aus dem Blutplasma. Typische klinische Beispiele sind die Fieberproteinurie (11; 31), die Proteinurie bei Herzinsuffizienz (15; 23) durch Überschuss von Katecholaminen ausgelöst und unter der Wirkung von Angiotensin II (Renin induzierte Proteinurie). Eine besondere

Bedeutung kommt dabei hämodynamischen Veränderungen zu. Das klassische Beispiel ist die orthostatische Proteinurie. Im 12 h Tagesurin zeigt die Urinanalyse eine unselektive Ausscheidung von Albumin und Globulinen, im 12 h Nachturin unter Liegend-Bedingungen nur geringe Mengen von Albumin. Dies wird in Orthostase durch Angiotensin II Überschuss ausgelöst und ist mit ACE-Hemmern deutlich zu reduzieren (71).

Die orthostatische Proteinurie betrifft vorwiegend schlanke Adoleszenten und wird u.a. durch orthostatische Kompression der Vena cava durch Hyperlordose induziert, dies führt zu einem erhöhten renalvenösen Druck und als Folge zur vermehrten glomerulären Proteinpermeabilität (32; 71; 77). Dieses Phänomen konnte von Yoshioka et al. in vivo als experimentelles Äquivalent gezeigt werden (101). Diese Autoren hatten auch gefunden, dass es zu einer Verschiebung mit Öffnung von „größeren Poren“ kommt, weil die Permeabilität für größere Dextranmoleküle deutlich zugenommen hatte. Auch hier war die Proteinurie durch einen ACE-Hemmer wieder trotz fortbestehender Venendruckerhöhung zu normalisieren.

Eisenbach hatte die Angiotensin II induzierte Proteinurie schon 1975 sogar durch Mikropunktion frühproximaler Tubuli nachgewiesen und kam durch Häufigkeitsanalyse zu ähnlichen Schlüssen, hatte aber noch keine ACE-Hemmer zur Verfügung (18). An der isoliert perfundierten Niere konnte durch Venendruckerhöhung die erhöhte Basisproteinurie noch wesentlich mehr erhöht werden, wie die folgende Abbildung zeigt.

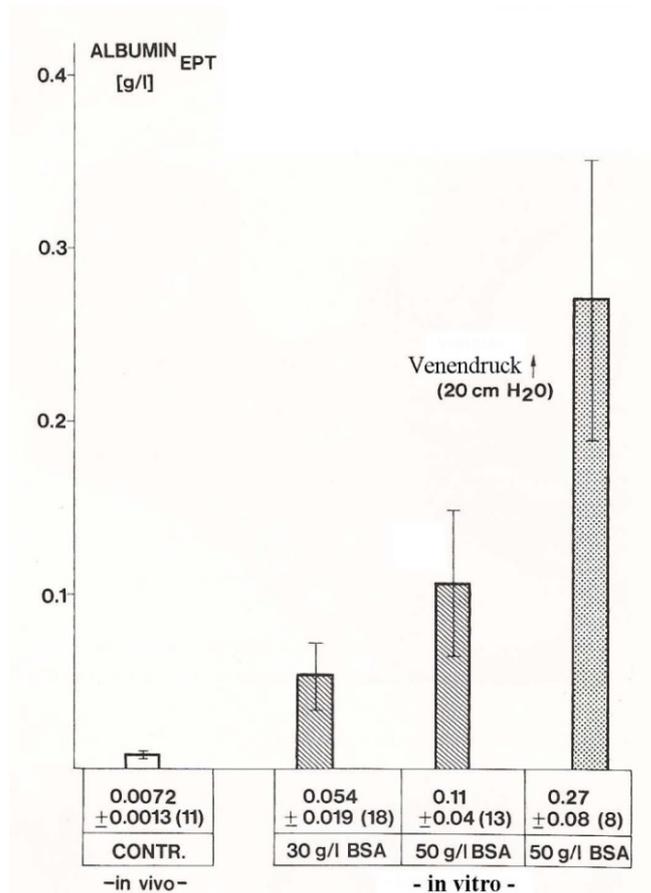


Abb. 5.3.1.: Vergleich der Analyse von frühproximalen Mikropunktionsproben (EPF) in vivo mit in vitro Befunden an der IPRK. Mit der Albuminkonzentration im Perfusat steigt auch die Albuminkonzentration in den Punktionsproben und erreicht das 10-20 fache der in vivo Proben. Durch eine Erhöhung des venösen Ablaufdrucks um 20 cm H₂O steigt die Albuminkonzentration weiter um Faktor 2,5. Die Graphik ist einer Arbeit von Stolte et al. entnommen, die in der Klinischen Wochenschrift (86) erschienen ist (heute: Journal of Molecular Medicine) und zusammen mit weiteren Daten im Kidney International (88).

Erwähnenswert ist, dass es bei Patienten nach unilateraler Nephrektomie passager zu einer geringen, aber deutlichen unselektiven Proteinurie kommt. Als Vorboten der Anpassungshypertrophie kommt es zu einer höheren Durchblutung und einem Anstieg der glomerulären Filtrationsrate (53; 77).

5.3.2 Die Mikrohämaturie bei der Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran

Die Grenze des Normalen bei der Ausscheidung von roten Blutzellen im Urin liegt bei Kindern höher als bei Erwachsenen (4; 8; 97). Die Dicke der glomerulären Basalmembran bei Kindern ist dünner und wächst mit zunehmendem Alter. Dies könnte dazu beitragen, die Zahl der glomerulär penetrierenden Erythrozyten zu reduzieren. Anders ist die Situation bei der Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran (27; 68; 77; 92). Dabei finden sich entweder homogen verdünnte Basalmembranen (<250 nm) oder nur abschnittsweise Partien einer verdünnten glomerulären Basalmembran (GBM) und dies sind die Prädilektionsstellen für die Erythrozytenpassage. Die normale GBM-Dicke liegt bei >250 bis 450 nm. Bei einem Kollektiv von 100 Patienten, die u.a. wegen einer Mikrohämaturie systematisch biopsiert wurden, war die Frequenz der Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran bei 11% (77). In der Studie von Tiebosch in den Niederlanden war die Frequenz noch höher (92), wahrscheinlich bedingt durch andere und zurückhaltendere Auswahlkriterien (zur Biopsie). Während die Mikrohämaturie um Faktor 10-50 höher als die Ausscheidung roter Blutzellen bei einem Normalkollektiv liegt, findet sich bei subtiler Analyse eine um Faktor 3 höhere Eiweißausscheidung (77). Interessant ist die Feststellung, dass kleinere Proteine bei der Passage durch die glomeruläre Barriere offensichtlich einen anderen Weg (andere Defekte) nehmen, denn im anderen Falle, bei Passage durch gleiche recht große Defekte (bis 250 nm) hätte man auch alpha-2-Makroglobulin nachweisen müssen, was aber praktisch ausgeschlossen wurde (26; 34-36). Neben den größeren Defekten, die von Erythrozyten geschlossen werden können sind kleinere Defekte denkbar, die demaskiert sind und von Mechanismen in vivo dann abgedichtet werden können, wenn die Basalmembran ausreichend dick ist, nicht aber bei homogen verdünnten oder nur abschnittsweise verdünnten Basalmembranen.

Ergänzung zum Unterschied der Ausscheidung von Erythrozyten bei Ratte und Mensch

Die Untersuchung der Zellausscheidung im Stoffwechselkäfig bei der Ratte ergab im Mittel 0,038 Erys/24 h und pro Glomerulus, im Unterschied dazu liegen die Zahlen beim Menschen bei 1-2 Erys/24 h und Glomerulus, das ist eine Grössenordnung höher. Eine denkbare Erklärung könnte darin liegen, dass Nierenvenen und Herz beim Vierbeiner hydrostastisch auf einer Höhe liegen, beim tagaktiven Menschen liegt der Abflussdruck der Nierenvenen dagegen höher, ein Unterschied, der in Liegeposition verschwinden dürfte, sollte diese Annahme stimmen. Interessant wäre eine Untersuchung von 2x12 h gesammeltem Urin im Tag- und Nachtsegment auf die Zellausscheidung parallel zur Proteinurie bei Patienten mit orthostatischer Proteinurie und/oder Patienten mit einer Glomerulopathie vom Typ der dünnen Basalmembran.

5.3.3 Die Mikrohämaturie unter der Wirkung von Antikoagulantien

Aus den klinischen Beobachtungen ist bereits lange bekannt, dass bei den Patienten unter Antikoagulationstherapie das Risiko einer spontanen oder traumatisch bedingten Blutung erhöht ist. Der Ausdruck einer Blutung im Harntrakt ist eine Mikro- oder sogar eine Makrohämaturie. Laut Literatur tritt eine Makrohämaturie bei 4-24% und Mikrohämaturie bei 40% der Patienten unter Antikoagulationstherapie auf (95). Die eigenen Untersuchungen von Patienten unter Antikoagulationstherapie zeigten einen Hämaturienachweis bei 66% der Patienten. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden zum Teil deformierte oder dysmorphe Erythrozyten als Ausdruck einer glomerulären Herkunft beobachtet. Die klassischen Akanthozyten wurden auf Grund der geringen Zahl der zellulären Elemente im Nativurin selten gesehen, weswegen leider keine sichere Aussage bezüglich des prozentuellen Anteiles der glomerulären Hämaturie möglich ist. Geschätzt wird der Anteil mit ca. 5-10% der Fälle. Unsere Untersuchungen haben somit das häufige Vorkommen der Hämaturie bei Patienten unter Antikoagulationstherapie vergleichbar mit der vorliegenden Literatur quantitativ belegen können.

Ähnlich wie bei der Wirkung der Antikoagulantien, sei es durch Hemmung der Thrombozytenaggregation oder durch den negativen Einfluss auf die Synthese von Gerinnungsfaktoren, ist eine Hämaturie auch ein häufiges Begleitsymptom der meist angeborenen Gerinnungsstörungen, welche unter dem klinischen Begriff „Hämophilie“ etabliert sind. Die Ursache dafür ist entweder ein Mangel an Gerinnungsfaktoren oder eine Funktionsstörung durch Hemmung verschiedener Gerinnungsfaktoren der komplexen Gerinnungskaskade.

Das Ausmaß der Hämaturie bei Hämophilie A-Patienten kann jedoch durch Substitution geringer Mengen des fehlenden Faktors, in diesem konkreten Falle des Faktors VIII, ohne nachweisbare Verbesserung der Gerinnungsstörung deutlich beeinflusst (reduziert) werden, was von Serner et al. (67) eindrucksvoll gezeigt werden konnte. Das heißt, dass bereits geringe Faktor VIII Dosen ohne wesentliche Veränderung der tatsächlichen plasmatischen Aktivität einen deutlichen hämostatischen Effekt mit signifikanter Rückbildung der zuvor nachweisbaren Hämaturie erzielt haben. Dieser Effekt der dauerhaften Hämaturiekorrektur wird durch eine direkte Wirkung des antihämophilen Globulins (Faktor VIII) auf die Kapillarwand begründet, welche dank Immunfluoreszenz im Tierexperiment nachgewiesen werden konnte. Im Umkehrschluss: durch Verminderung der plasmatischen Faktors VIII mittels Anti-Faktor VIII-Antiserum wurde eine Zunahme der Kapillarpermeabilität für nuklidmarkiertes Albumin sowie das Auftreten von Blutungen gezeigt. Die dabei registrierte Verzögerung zwischen der Abnahme der plasmatischen Faktor VIII-Aktivität und der Entstehung einer Blutung wurde durch eine Veränderung der Gefäßwand bei Erschöpfung des Faktor VIII und nicht allein durch den Gerinnungsdefekt selber begründet (67). Der oben genannte Nachweis der signifikanten Wirkung des Gerinnungsfaktors auf die Permeabilität der Kapillarwand untermauert die Hypothese der physiologischen Defekte der glomerulären Kapillarwand, welche sonst durch verschiedene Blutkomponenten und schließlich auch durch die Gerinnungsfaktoren abgedichtet sind. Aus der gestörten Funktion oder Fehlen der Gerinnungsfaktoren resultiert nicht nur eine Veränderung des Blutes, sondern auch eine Erhöhung der Permeabilität der

glomerulären Kapillarwand, was schließlich unter anderem zu einer glomerulären Hämaturie führen kann.

6. Zusammenfassung

Die Hämaturie ist ein häufiges Symptom der zahlreichen urologischen und nephrologischen Erkrankungen, welches oft als erster Warnhinweis gesehen wird. Zur Abklärung einer Hämaturie werden unterschiedlich aufwendige diagnostische Maßnahmen eingesetzt wie Röntgendiagnostik, endoskopische Techniken, Urinzytologie oder Nierenbiopsie. Das Ziel ist dabei die Blutungs- oder Erythrozytenverlustquelle festzustellen, sei es im oberen oder unteren Harntrakt oder in der Niere selbst. Wichtig erscheint die Frage, ob eine Hämaturie renaler oder postrenaler Herkunft ist. Liegt zusätzlich als Symptom noch eine Proteinurie vor, kann eine renale bzw. glomeruläre Erkrankung als Ursache angenommen werden. Einer Hämaturie oder Proteinurie muss aber nicht zwangsläufig eine Erkrankung als Ursache zugrunde liegen. Auch unter physiologischen Bedingungen, wie z.B. unter sportlicher Belastung kann es auf Grund eines Zusammenspiels mehrerer Hormone mit konsekutivem Einfluss auf die glomeruläre Hämo- sowie Filtrationsdynamik mit fokalen hämodynamischen Störungen oder Ausbildung von Membrandefekten zur Erhöhung der glomerulären Proteinpermeabilität kommen und sogar bedingt durch größere Membrandefekte zu einer Mikro- oder Makrohämaturie.

Ein bekanntes experimentelles Modell, welches einen Einblick in die komplexe Physiologie der Niere ermöglichen kann, ist eine isolierte, perfundierte Rattenniere (IPRK). Durch Untersuchungen an der isolierten, zellfrei perfundierten Rattenniere wurde gezeigt, dass es bereits nach wenigen Minuten der Perfusionszeit zu einer deutlich erhöhten glomerulären Albuminpermeabilität kommt. Dagegen hatte eine Zugabe von 5% Erythrozyten eine deutliche Reduktion der Albuminpermeabilität zur Folge. 1986 wurde von Schurek et al. die „repaired defect“ Hypothese der glomerulären Kapillarwand formuliert: die glomerulären Kapillaren weisen vereinzelt „physiologische Membrandefekte“ auf, die durch „Reparationsmechanismen“ des Organismus

mit Hilfe von Gerinnungsfaktoren, Makromolekülen oder zellulären Elementen abgedichtet werden. Unterbleibt der Nachschub an "Reparationsmaterial", wie bei zellfreier Perfusion mit Albumin, werden die maskierten Defekte freigelegt. In der Folge finden sich durch das Herauslösen von "Abdichtungs-Erythrozyten" aus der Kapillarwand eine exponentiell abnehmende Mikrohämaturie und eine zunehmende Proteinurie. Der Zusatz von Erythrozyten zum Perfusat führt zur Abdichtung einzelner größerer Defekte mit dem Resultat einer verminderten Permeabilität für Protein, wobei offensichtlich durch die permanente Durchwanderung immer wieder nachfolgender Erythrozyten durch die verbliebenen größeren Defekte eine Mikrohämaturie über die Zeitdauer persistiert.

Das Ziel der Arbeit war es, neben der experimentell ausreichend belegten erhöhten Proteinurie eine quantitativ ausreichende Analyse zur Ausscheidung von Erythrozyten vorzulegen, um die experimentelle Grundlage der diskutierten Hypothese zu verbreitern. Die Auswertung der experimentellen Daten zeigte, dass es bei zellfreier Perfusion zu einer exponentiellen Abnahme der Erythrozytenausscheidung kommt. Bei höherem Filtrat und Urinzeitvolumen kam es zu einer schnelleren Abnahme der Erythrozytenausscheidung. Bei einem Zusatz von 5% Erythrozyten zum Perfusat fiel die Erythrozytenausscheidung auf ein bleibendes Niveau von ca. 100 Zellen/min ab, welche um ein mehrfaches höher als unter in vivo Bedingungen liegt. Unter Berücksichtigung der erhöhten glomerulären Permeabilität von Albumin im gleichen experimentellen Modell können die erhobenen Befunde die formulierte Hypothese der „repaired defects“ weiter untermauern.

Als Nebenbefund wurde im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung des Urinsediments bei der zellfreien Perfusion der Ratten-Niere ein besonderes Phänomen beobachtet: ab der 30. Minute der Perfusion zeigten sich im Urin Epithelien bzw. Epithelfragmente was bei Zusatz von 5 % Erythrozyten zum Perfusat auf Grund der besseren Sauerstoffversorgung nicht zu beobachten war. Die Ursache für das Auftreten von Epithelzellen im Urinsediment sind die

hypoxischen tubulären Schäden, welche bei zellfreier Perfusion in bestimmten Arealen des äußeren Marks entstehen.

Um auch klinische Gesichtspunkte zur Unterstützung der Arbeitshypothese zu erhalten, wurden in gleicher Zähltechnik Urinalysen von Patienten unter Antikoagulationstherapie untersucht. Die Patienten wurden in insgesamt vier Gruppen unterteilt: Patienten unter ASS-, ASS- + Plavix- und Marcumar-Therapie sowie eine Kontrollgruppe.

Bei den klinischen Untersuchungen des Patientenurins unter Antikoagulationstherapie im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne o.g. Therapie wurde die bereits bekannte Tatsache, dass bei den Patienten unter dem Einfluss diverser Antikoagulantien eine Hämaturie als Begleitsymptom häufiger vorliegt, differenziert bestätigt. Aus diesen Daten könnte man schließen, dass eine Hemmung der Thrombozytenaggregation sich auf die Hämaturie stärker auswirkt als eine Hemmung der plasmatischen Gerinnung, statistisch waren diese Unterschiede aber nicht zu sichern. Das häufigere Vorkommen einer Hämaturie bei Patienten unter einer Antikoagulationstherapie unterstützt die Hypothese, dass es in den glomerulären Kapillaren Defekte gibt, welche unter physiologischen Bedingungen unter anderem mit Hilfe von Gerinnungsfaktoren abgedichtet sind und unter pathophysiologischen Bedingungen demaskiert werden können und demzufolge zu Proteinurie und Mikrohämaturie führen. In Hinblick auf die hier gesammelten klinischen Daten kann man davon ausgehen, dass das Gerinnungs-Potential des Blutes eine wichtige Rolle bei der Abdichtung der oben genannten glomerulären Defekte spielt, wie dies bereits früher vermutet wurde.

Im Zusammenhang mit der Diagnostik des akuten Nierenversagens wird eine frühe Analyse des Urinsediments viel zu selten genutzt. Es ist ein einfaches Verfahren, das aber nicht delegiert werden sollte, weil es Erfahrung beim Mikroskopieren voraussetzt.

Zusammenfassend ist zu hoffen, dass diese Arbeit zur Unterstützung der „repaired defect“ Hypothese einen überzeugenden, weiteren Beitrag geleistet hat.

7. Literatur

1. Alcorn D, Emslie KR, Ross BD, Ryan GB and Tange JD. Selective distal nephron damage during isolated kidney perfusion. *Kidney Int* 19: 638-647, 1981.
2. Assel E, Neumann KH, Schurek HJ, Sonnenburg C and Stolte H. Glomerular albumin leakage and morphology after neutralization of polyanions. I. Albumin clearance and sieving coefficient in the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol* 7: 357-364, 1984.
3. Avidor Y, Nadu A and Matzkin H. Clinical significance of gross hematuria and its evaluation in patients receiving anticoagulant and aspirin treatment. *Urology* 55: 22-24, 2000.
4. Bader P and Mohaupt MG. Mikrohämaturie - Wie weiter? *Urologe A* 39: 446-454, 2000.
5. Barthels M. Hämaturie bei Koagulopathien. *Monatsschr Kinderheilkd* 125: 749-751, 1977.
6. Basar E and Weiss C. Analyse des Frequenzganges druckinduzierter Änderungen des Strömungswiderstandes isolierter Rattennieren. *Pflügers Arch* 304: 121-135, 1968.
7. Bekersky I. Use of the isolated perfused kidney as a tool in drug disposition studies. *Drug Metab Rev* 14: 931-960, 1983.
8. Benz MR and Reiter K. Hämaturie und Proteinurie im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 152: 238-247, 2004.
9. Birch DF and Fairley KF. Haematuria: glomerular or non-glomerular? *Lancet* 2: 845-846, 1979.
10. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA, Forbes I, Fairley JK, Cheshire GR and Ryan GB. Urinary erythrocyte morphology in the diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 20: 78-84, 1983.

11. Boesken WH, Mamier A, Neumann H and Engelhardt R. Gibt es die "febrile Proteinurie". *Klin Wochenschr* 61: 917-922, 1983.
12. Bohle A, von Gise H., Mikeler E and Rassweiler J. Morphologic contribution on gross hematuria in mild mesangioproliferative glomerulonephritis without crescents. *Klin Wochenschr* 63: 371-378, 1985.
13. Bohrer MP, Deen WM, Robertson CR and Brenner BM. Mechanism of angiotensin II-induced proteinuria in the rat. *Am J Physiol* 233: F13-F21, 1977.
14. Brenner BM, Baylis C and Deen WM. Transport of molecules across renal glomerular capillaries. *Physiol Rev* 56: 502-534, 1976.
15. Carrie BJ, Hilberman M, Schroeder JS and Myers BD. Albuminuria and the permselective properties of the glomerulus in cardiac failure. *Kidney Int* 17: 507-514, 1980.
16. Ciarimboli G, Schurek HJ, Zeh M, Flohr H, Bokenkamp A, Fels LM, Kilian I and Stolte H. Role of albumin and glomerular capillary wall charge distribution on glomerular permselectivity: studies on the perfused-fixed rat kidney model. *Pflügers Arch* 438: 883-891, 1999.
17. Culclasure TF, Bray VJ and Hasbargen JA. The significance of hematuria in the anticoagulated patient. *Arch Intern Med* 154: 649-652, 1994.
18. Eisenbach GM, Liew JB, Boylan JW, Manz N and Muir P. Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: a micropuncture study. *Kidney Int* 8: 80-87, 1975.
19. Fairley KF and Birch DF. Hematuria: a simple method for identifying glomerular bleeding. *Kidney Int* 21: 105-108, 1982.
20. Fairley KF and Birch DF. Microscopic urinalysis in glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 42: S9-12, 1993.
21. Fassett RG, Owen JE, Fairley J, Birch DF and Fairley KF. Urinary red-cell morphology during exercise. *Br Med J (Clin Res Ed)* 285: 1455-1457, 1982.

22. Feld LG, Van Liew JB, Galaske RG and Boylan JW. Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 12: 332-343, 1977.
23. Göbel U, Klenke KH, Günther KH and Natusch R. Auftreten und Verhalten der Proteinurie bei Herzinsuffizienz. *Dt Gesundh -Wesen* 39: 653-655, 1984.
24. Goodman SG, Langer A, Durica SS, Raskob GE, Comp PC, Gray RJ, Hall JH, Kelley RP, Hua TA, Lee RJ and . Safety and anticoagulation effect of a low-dose combination of warfarin and aspirin in clinically stable coronary artery disease. Coumadin Aspirin Reinfarction (CARS) Pilot Study Group. *Am J Cardiol* 74: 657-661, 1994.
25. Greger R. Glomeruläre Filtration. In: Deetjen P und Speckmann EJ (Hrsg). Lehrbuch der Physiologie, München: Urban & Schwarzenberg, 1994, S. 365.
26. Guder WG and Hofmann W. Differentiation of proteinuria and haematuria by single protein analysis in urine. *Clin Biochem* 26: 277-282, 1993.
27. Haas M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 133: 224-232, 2009.
28. Haraldsson B, Nystrom J and Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88: 451-487, 2008.
29. Haraldsson BS, Johnsson EK and Rippe B. Glomerular permselectivity is dependent on adequate serum concentrations of orosomucoid. *Kidney Int* 41: 310-316, 1992.
30. Hasegawa M, Tanaka T, Kii T, Fujiwara S, Ikeda N, Kinntaka D, Takeuti T, Tanaka H and Ikemoto T. [Acquired inhibitor against coagulation factor V with severe hematuria]. *Rinsho Ketsueki* 44: 933-939, 2003.
31. Hemmingsen L and Skaarup P. Urinary excretion of ten plasma proteins in patients with febrile diseases. *Acta Med Scand* 201: 359-364, 1977.

32. Hofmann W and Edel HH. Harnuntersuchung zur differenzierten Diagnostik einer Proteinurie. *Dt Ärzteblatt* 98 A: 756-763, 2001.
33. Hofmann W and Guder WG. A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. *J Clin Chem Clin Biochem* 27: 589-600, 1989.
34. Hofmann W, Rossmüller B, Guder WG and Edel HH. A new strategy for characterizing proteinuria and haematuria from a single pattern of defined proteins in urine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30: 707-712, 1992.
35. Hofmann W, Schmidt D, Guder WG and Edel HH. Differentiation of hematuria by quantitative determination of urinary marker proteins. *Klin Wochenschr* 69: 68-75, 1991.
36. Hofstra JM and Wetzels JF. Urinary albumin: total protein ratio--a new diagnostic tool to differentiate glomerular from nonglomerular hematuria. *Nat Clin Pract Nephrol* 4: 590-591, 2008.
37. Holme PA, Brosstad F and Tjonnfjord GE. Acquired haemophilia: management of bleeds and immune therapy to eradicate autoantibodies. *Haemophilia* 11: 510-515, 2005.
38. Ichimura K, Stan RV, Kurihara H and Sakai T. Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions. *J Am Soc Nephrol* 19: 1463-1471, 2008.
39. Jai-Trung L, Hiroyoshi W, Hiroshi M, Masuji H, Hisako T, Fumiko U, Akira S, Koji N and Kiyoyasu N. Mechanism of hematuria in glomerular disease. *Nephron* 35: 68-72, 1983.
40. Kincaid-Smith P, Owen J and Hewitson T. Unexplained Haematuria. *BMJ* 302: 177, 1991.
41. Kincaid-Smith P and Fairley K. The investigation of hematuria. *Semin Nephrol* 25: 127-135, 2005.
42. Kohler H, Wandel E and Brunck B. Acanthocyturia--a characteristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int* 40: 115-120, 1991.

43. Krautzig S. Glomeruläre Erkrankungen. In: Reiz-Polster H and Braun J (Hrsg). *Innere Medizin*, Urban & Fischer, 2001, p. 867.
44. Kriz W. Fenestrated glomerular capillaries are unique. *J Am Soc Nephrol* 19: 1439-1440, 2008.
45. Landis EM and Pappenheimer JR. Circulation: Exchange of substances through capillary walls. In: *Handbook of Physiology*, edited by Hamilton WF and Dow P. Washington D.C.: American Physiological Society, 1963, p. 961-1034.
46. Maack T. Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 238: F71-F78, 1980.
47. Maack T. Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int* 30: 142-151, 1986.
48. Makino H, Nishimura S, Soda K, Takaoka M, Kaneshige T and Ota Z. Mechanism of hematuria. I. Electron microscopic demonstration of the passage of a red blood cell through a glomerular capillary wall in rat masugi nephritis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 50: 199-208, 1986.
49. Mann J and Ritz E. Rationelle Diagnostik der Hämaturie [Rational diagnosis of hematuria]. *Dtsch Med Wochenschr* 112: 1306-1309, 1987.
50. Masri MA, Boyd ND and Mandin H. Role of fibrinogen in the glomerular permeability of the perfused, isolated dog kidney. *Kidney Int* 27: 807-810, 1985.
51. Nishiitsutsuji-Uwo JM, Ross BD and Krebs HA. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J* 103: 852-862, 1967.
52. Nobiling R, Münter K, Bührle CP and Hackenthal E. Influence of pulsatile perfusion upon renin release from the isolated perfused rat kidney. *Pflügers Arch* 415: 713-717, 1990.

53. Oberle G, Neumann HP, Schollmeyer P, Boesken WH and Stahl RA. Mild proteinuria in patients with unilateral kidney. *Klin Wochenschr* 63: 1048-1051, 1985.
54. Okoshi Y, Akiyama H, Inoue T, Koyama T, Kono N, Matsumura T, Mizuchi D, Mori S, Ohashi K and Sakamaki H. [A long-lasting idiopathic factor V inhibitor]. *Rinsho Ketsueki* 44: 14-18, 2003.
55. Pagel H. *Zum glomerulären Mechanismus der renalen Proteinausscheidung*. Dissertation, Universität Hannover, FB Biologie. 1986.
56. Pagel H and Stolte H. On the glomerular mechanism of the renal protein excretion. Studies in the isolated perfused rat kidney. *Ren Physiol Biochem* 15: 249-256, 1992.
57. Pavenstädt H, Kriz W and Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253-307, 2003.
58. Pollock C, Pei-Ling L, Gyory AZ, Grigg R, Gallery ED, Caterson R, Ibels L, Mahony J and Waugh D. Dysmorphism of urinary red blood cells--value in diagnosis. *Kidney Int* 36: 1045-1049, 1989.
59. Rahgozar M, Guan Z, Matthias A, Gobe GC and Endre ZH. Angiotensin II facilitates autoregulation in the perfused mouse kidney: An optimized in vitro model for assessment of renal vascular and tubular function. *Nephrology (Carlton)* 9: 288-296, 2004.
60. Reale E, Luciano L and Kuhn KW. Ultrastructural architecture of proteoglycans in the glomerular basement membrane. A cytochemical approach. *J Histochem Cytochem* 31: 662-668, 1983.
61. Rennke HG, Olson JL and Venkatachalam MA. Glomerular filtration of macromolecules: normal mechanisms and the pathogenesis of proteinuria. *Contrib Nephrol* 24: 30-41, 1981.
62. Röckel A, Hertel J, Fiegel P, Abdelhamid S, Panitz N and Walb D. Permeability and secondary membrane formation of a high flux polysulfone hemofilter. *Kidney Int* 30: 429-432, 1986.

63. Rodewald R and Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60: 423-433, 1974.
64. Ross BD. The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med Suppl* 55: 513-521, 1978.
65. Rostgaard J and Qvortrup K. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier? *Cells Tissues Organs* 170: 132-138, 2002.
66. Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD and Brown D. Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 20: 489-494, 2009.
67. Ryan GB and Karnovsky MJ. Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney Int* 9: 36-45, 1976.
68. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzza M, Dagher H and Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int* 64: 1169-1178, 2003.
69. Schaeffer J, Olbricht CJ and Koch KM. Long-term performance of hemofilters in continuous hemofiltration. *Nephron* 72: 155-158, 1996.
70. Schiessl IM and Castrop H. Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1189-F1200, 2013.
71. Schurek HJ, Ciarimboli G and Helmchen U. Orthostatische Proteinurie. Ist es ein intrarenaler Mechanismus? *Kidney & Blood Pressure Research* 22: 228 Abstract A104, 1999.
72. Schurek HJ, Pagel H, Thole H, Neumann KH, Alt J, Bahlmann J and Stolte H. Die "repaired defect" Hypothese der glomerulären Kapillarwand. Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenniere. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 15: 368, 1986.

73. Schurek HJ, Schwietzer G., Alt JM and Stolte H. *Albumin filtration and effective filtration pressure in cortical nephrons in the isolated perfused rat kidney*. Proceedings of the VIIIth International Congress of Nephrology, Montreal, AX4, S. Karger, Basel München Paris London New York Sydney: 1978.
74. Schurek HJ. Application of the isolated perfused rat kidney in nephrology. *Contrib Nephrol* 19: 176-190, 1980.
75. Schurek HJ. *Untersuchungen zur Pathophysiologie der Niere bei Hypoproteinaemie* Habilitationsschrift. Medizinische Hochschule Hannover, 1981.
76. Schurek HJ. Physiologische und pathophysiologische Grundlagen der glomerulären Permeabilität für Plasmaproteine. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 93: 466-472, 1987.
77. Schurek HJ. Mechanisms of glomerular proteinuria and hematuria. *Kidney Int Suppl* 47: S12-S16, 1994.
78. Schurek HJ and Alt JM. Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. *Am J Physiol* 240: F569-F576, 1981.
79. Schurek HJ, Brecht JP, Lohfert H and Hierholzer K. The basic requirements for the function of the isolated cell free perfused rat kidney. *Pflügers Arch* 354: 349-365, 1975.
80. Schurek HJ and Kriz W. Morphologic and functional evidence for oxygen deficiency in the isolated perfused rat kidney. *Lab Invest* 53: 145-155, 1985.
81. Schurek HJ, Neumann KH, Flohr H, Zeh M and Stolte H. The physiological and pathophysiological basis of glomerular permeability for plasma proteins and erythrocytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30: 627-633, 1992.
82. Sernerri GG, Gensini GF and Gensini RA. Correction of the haemostatic defect in haemophiliacs without apparent correction of the coagulation defect. *Haemostasis* 3: 149-157, 1974.

83. Stefanidis I, Heintz B, Stöcker G, Haubeck HD, Probst W and Sieberth HG. Biochemical characterization of urinary proteins after renal transplantation. *Kidney Int* 47: 1001, 1995.
84. Stefanidis I, Heintz B, Stocker G, Mrowka C, Sieberth HG and Haubeck HD. Association between heparan sulfate proteoglycan excretion and proteinuria after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 7: 2670-2676, 1996.
85. Stejskal J, Pirani CL, Okada M, Mandelanakis N and Pollak VE. Discontinuities (gaps) of the glomerular capillary wall and basement membrane in renal diseases. *Lab Invest* 28: 149-169, 1973.
86. Stolte H, Alt J and Schurek HJ. Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Differentialdiagnostik der Proteinurie. *Klin Wochenschr* 57: 1069-1079, 1979.
87. Stolte H, Alt JM, Baldamus CA, Galaske RG and Schurek HJ. Direct assessment of the glomerular sieving coefficient for albumin in the rat kidney. *Kidney Int* 11: 220, 1977.
88. Stolte H, Schurek HJ and Alt JM. Glomerular albumin filtration: a comparison of micropuncture studies in the isolated perfused rat kidney with in vivo experimental conditions. *Kidney Int* 16: 377-384, 1979.
89. Swanson JW, Besarab A, Pomerantz PP and DeGuzman A. Effect of erythrocytes and globulin on renal functions of the isolated rat kidney. *Am J Physiol* 241: F139-F150, 1981.
90. Taft DR. The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Curr Drug Discov Technol* 1: 97-111, 2004.
91. Thole H. *Zum Mechanismus der Angiotensin II induzierten Proteinurie*. Dissertation. Medizinische Hochschule Hannover, 1988.
92. Tiebosch AT, Frederik PM, van Breda Vriesman PJ, Mooy JM, van RH, van de Wiel TW, Wolters J and Zeppenfeldt E. Thin-basement-membrane nephropathy in adults with persistent hematuria. *N Engl J Med* 320: 14-18, 1989.

93. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10: 2440-2445, 1999.
94. Tryggvason K, Patrakka J and Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354: 1387-1401, 2006.
95. Van Savage JG and Fried FA. Anticoagulant associated hematuria: a prospective study. *J Urol* 153: 1594-1596, 1995.
96. Weiss C, Passow H and Rothstein A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol* 196: 1115-1118, 1959.
97. Wirnsberger G, Schröttner B and Worm H. Die renale Hämaturie. *Journal für Urologie und Urogynäkologie* 10: 36-38, 2003.
98. Wollin T, Laroche B and Psooy K. Canadian guidelines for the management of asymptomatic microscopic hematuria in adults. *Can Urol Assoc J* 3: 77-80, 2009.
99. Xie WH. *Alteration of membrane properties during continuous hemofiltration therapie in vivo*. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 2014.
100. Xie WH, Heidenreich S, Abbas S and Mann H. Alteration of membrane properties in hemofiltration during continuous hemofiltration (CVVH). *ASAIO J* 55 (1): 178, 2009.
101. Yoshioka T, Mitarai T, Kon V, Deen WM, Rennke HG and Ichikawa I. Role for angiotensin II in an overt functional proteinuria. *Kidney Int* 30: 538-545, 1986.

8. Anhang Tabellarium

Tabelle 8.0.: Erythrozytenzählung im Urinsediment. Beispiel für eine Excel Berechnungs- und Auswertungstabelle für einen Versuch im single-pass Modus mit sehr früh gesammelten Urinproben (Vorperioden) und ab 15 min im 10 minütigen Intervall. Nach Zentrifugation wurde der Überstand für die restliche Analytik verwendet, das Sediment im verbliebenen Restvolumen resuspendiert und in der Zählkammer eingesetzt. Das Urinvolumen wurde gravimetrisch in vorab gewogenen Sammelgefäßen auf einer Feinwaage bestimmt, ebenso alle Zwischenschritte bis zum Resuspensionsvolumen. Bei großen Urinvolumina musste in kleinere Gefäße umgefüllt werden. Im beispielhaft dargestellten Experiment wurde in den kurzen Vorperioden in 2ml Eppendorfgefäßen gesammelt, danach in 10ml Reagenzröhrchen, ein Aliquot mit dem kompletten Sediment dann umgefüllt auf 2ml Eppendorfgefäße. Die Eingruppierung der ausgeschiedenen Epithelien bzw. Epithelfragmente war semiquantitativ in: vereinzelt = 1; + = 2; ++ = 3

	Versuch	14.12.							
zellfreie Perfusion	Vorperioden			U1	U2	U3	U4	U5	U6
Versuchs Nr.: V1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Perfusionsdruck mmHg	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Sammelperiode min von	3,5	7,5	11	15	25	35	45	55	66
bis	6,5	9,5	13	25	35	45	55	66	75
Sammelgewicht mg	1315	1842	2126	11597	12244	12235	13178	13854	12709
Leergewicht mg	902	902	900	5614	5808	5638	5730	5734	5643
Urinvolumen µl	413	940	1226	5983	6436	6597	7448	8120	7066
Sammelzeit min	3	2	2	10	10	10	10	11	9
Urinvolumen/min µl	138	470	613	598	644	660	745	738	785
Restgewicht + Erys mg	963	951	944	969	946	968	951	935	941
Leergewicht mg	902	902	900	902	904	906	899	904	905
Resuspensionsvol. µl	61	49	44	67	42	62	52	31	36
Zahl der Erys pro µl	11900	460	380	30	10	0	0	0	0
Erythrozyten pro Resuspensionsvolumen	725900	22540	16720	2010	420	0	0	0	0
ausgeschiedene Erys/min	241967	11270	8360	201	42	0	0	0	0
Epithelien					vereinzelt	++	+	+	+

Tabelle 8.1.: Mittelwertstatistik der ausgeschiedenen Zahl von Erythrozyten im Zeitverlauf. Die angegebene Zeit entspricht der Mitte der jeweiligen Sammelperiode und ist in Modus 1-3 der verschiedenen Perfusionsmethoden zusammengestellt.

* Entspricht im Perfusions-Modus 3 (Rezirkulation, BSA 5 %, 5 % Erys) dem Mittelwert aller Einzelmessungen zwischen der 75. und 120. Minute (zeitliche Mitte 97,5 min).

Tabellen		single pass Modus			Rezirkulation			Rezirkulation			
Format		kolloidfrei ohne Erys			BSA 5%, zellfrei			BSA 5%, 5% Erys			
XY	Zeit (min)	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	
1	3,5	140150	41771	12							
2	7,5	19332	7035	13							
3	12,5	6836	2411	13							
4	15,0				4847	1851	8				
5	20,0	294	138	11							
6	22,5							5761	995	6	
7	25,0				1373	562	8				
8	30,0	142	72	11							
9	35,0				582	205	9				
10	37,5							1061	326	7	
11	40,0	69	47	11							
12	45,0				142	55	9				
13	50,0	7	5	11							
14	52,5							425	220	5	
15	55,0				41	22	9				
16	60,0	0	0	5							
17	65,0				27	15	9				
18	67,5							276	97	9	
19	70,0	0	0	4							
20	75,0				9	10	9				
21	82,5							104	20	8	
22	85,0				5	6	9				
23	92,5										
24	95,0				5	6	9				
25	97,5							117	14	18	*
26	103,0										
27	112,5							107	33	3	

Tabelle 8.2.: Daten der klinischen Kontrollgruppe zur Mikrohämaturie mit Häufigkeitsanalyse. Unter Besonderheiten sind mikroskopisch registrierte Bakterien, Leukozyten bzw. Kristalle notiert, ohne dass es klinische Hinweise für einen Harnwegsinfekt gab. Die Häufung beim weiblichen Geschlecht weist auf Kontaminationen des Spontanurins hin.

Mikrohämaturie Kontrolle Gesamtkollektiv								
lfd Nr	Geschlecht	Alter Jahre	S-Kreatinin mg%	eGFR ml/min	Erys gezählt	Erys/ μ l	U-Protein mg%	Besonder- heiten
1	m	78	1,05	68	0	0	0	
2	m	49	0,74	112	0	0	0	
3	m	32	0,80	111	0	0	0	
4	m	16	0,75	149	0	0	0	
5	m	26	1,11	80	0	0	0	
6	m	44	0,79	107	0	0	0	
7	m	47	0,86	95	0	0	0	
8	m	19	0,79	126	0	0	0	
9	m	86	1,76	37	0	0	0	
10	m	21	0,95	100	0	0	0	
11	m	56	0,79	101	0	0	0	
12	m	76	0,67	115	0	0	0	Bakt.
13	m	57	0,88	89	0	0	0	
14	m	22	0,90	106	0	0	0	
15	m	53	1,36	55	0	0	0	
16	m	74	0,80	94	0	0	0	
17	m	84	1,11	63	0	0	0	
18	m	70	1,44	48	0	0	0	
19	m	45	1,07	75	0	0	0	
20	m	42	0,79	108	0	0	0	
21	m	18	0,80	126	0	0	0	
22	m	77	0,72	106	0	0	0	
23	m	59	0,73	110	0	0	0	
24	m	60	0,98	78	0	0	0	
25	m	62	0,83	94	0	0	0	
26	m	70	1,00	74	0	0	0	
27	m	63	0,92	83	0	0	0	
28	m	44	1,06	76	0	0	0	
29	m	61	0,88	88	0	0	0	
30	m	28	0,73	128	0	0	0	
31	m	67	1,01	74	0	0	0	
32	m	58	1,27	58	0	0	0	
33	m	58	1,27	58	0	0	25	
34	m	14	0,76	137	0	0	0	
35	m	53	0,63	133	0	0	0	
36	m	79	1,03	70	0	0	0	
37	m	44	0,96	85	1	10	25	
38	m	24	0,73	98	0	0	0	
39	m	69	0,68	123	0	0	0	
40	m	46	0,76	110	0	0	0	
41	m	59	0,82	96	0	0	0	
42	m	47	0,88	93	0	0	0	
43	m	67	1,09	141	0	0	0	
44	m	11	0,58	156	0	0	0	
45	m	75	1,36	51	3	30	25	Leuk.

46	m	29	0,90	100	0	0	0	
47	m	77	0,81	92	0	0	0	
48	m	81	0,88	83	0	0	0	
49	m	33	0,83	107	0	0	0	
50	m	52	0,98	80	0	0	0	
51	w	51	0,79	84,8	0	0	0	
52	w	78	2,03	24	0	0	150	Bakt.
53	w	82	0,98	54	0	0	0	Bakt.
54	w	72	0,85	66	0	0	0	
55	w	16	0,75	103	1	10	0	Bakt.
56	w	20	0,69	108	0	0	0	
57	w	18	0,85	87	0	0	0	Bakt.
58	w	24	0,80	88	1	10	0	Bakt.
59	w	63	0,93	61	0	0	0	
60	w	17	0,73	105	0	0	0	
61	w	58	0,65	94	0	0	75	
62	w	39	0,65	101	0	0	25	Leuk.
63	w	32	0,67	102	0	0	0	
64	w	34	0,45	157	0	0	0	
65	w	62	0,76	77	1	10	0	Leuk.
66	w	46	0,68	93	0	0	0	Bakt.
67	w	9	0,53	148	1	10	25	Bakt.
68	w	24	0,78	91	0	0	0	
69	w	22	0,66	112	0	0	0	Leuk.
70	w	60	0,73	81	0	0	0	
71	w	76	1,03	52	0	0	0	
72	w	35	0,72	92	0	0	0	
73	w	33	0,99	65	0	0	0	
74	w	71	1,15	47	0	0	0	
75	w	94	0,96	54	0	0	0	Leuk.
76	w	31	0,71	96	0	0	0	
77	w	30	0,46	160	0	0	0	
78	w	76	0,70	81	1	10	0	Leuk.
79	w	78	0,70	81	0	0	0	
80	w	71	0,67	87	0	0	0	Leuk.
81	w	64	0,97	58	0	0	0	
82	w	56	0,64	96	0	0	0	
83	w	44	0,71	89	0	0	0	
84	w	39	0,82	78	0	0	0	
85	w	42	0,67	97	0	0	0	Bakt.
86	w	20	0,84	86	1	10	0	Bakt.
87	w	43	0,62	105	0	0	0	
88	w	66	0,78	74	0	0	0	
89	w	83	0,72	77	0	0	0	
90	w	66	0,69	85	0	0	0	
91	w	80	1,27	40	0	0	0	
92	w	27	0,59	122	0	0	0	
93	w	55	0,66	93	0	0	0	Leuk.
94	w	32	0,52	137	0	0	0	
95	w	75	0,82	68	2	20	0	
96	w	32	0,43	170	0	0	0	
97	w	81	1,12	47	1	10	75	Leuk.
98	w	26	0,68	105	0	0	0	Leuk.
99	w	10	0,43	157	0	0	0	
100	w	7	0,41	163	0	0	25	
101	w	54	0,69	89	0	0	0	
102	w	81	1,41	48	0	0	0	

103	w	26	0,74	95	0	0	0	
104	w	41	0,63	104	0	0	0	
	MW	49,6	0,8	93,1	0,1	1,3	4,3	10 x Bakterien
	SD	22,3	0,3	29,5	0,4	4,3	18,5	10 x Leukozyten
	SEM	2,20	0,03	2,91	0,04	0,43	1,82	
	n	104	104	104	104	104	104	
	Altersspanne		7-94					

Kontrollkollektiv		Häufigkeitsanalyse	
Erys/ μ l	Klassen	Häufigkeit	Häufigkeit in %
0 bis	1	94	90,3
1 bis	10	8	7,7
10 bis	20	1	1
20 bis	30	1	1
30 bis	40	0	
40 bis	50	0	
50 bis	60	0	
60 bis	80	0	
80 bis	100	0	
100 bis	120	0	
120 bis	140	0	
140 bis	160	0	
160 bis	180	0	
180 bis	200	0	
200 bis	220	0	
220 bis	240	0	
240 bis	260	0	
260 bis	280	0	
	>280	0	
	Summe	104	100

Tabelle 8.3.: Patientenkollektiv unter Therapie mit Phenprocoumen (Marcumar®). Das mittlere Alter liegt um 20 Jahre höher als bei dem Kontrollkollektiv. Für die Fragestellung der Arbeit zur Mikrohämaturie war in der Kontrollgruppe eine Selektion nach Altersgruppen zum Vergleich nicht vorgenommen worden.

Mikrohämaturie Marcumar Gesamtkollektiv								
lfd		Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/ μ l	U-Protein	Besonder-
Nr	Geschlecht		mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
1	m	59	1,06	72	2	20	-	Urat
2	w	72	1,84	27	53	530	75	
3	m	63	2,04	33	6	60	75	
4	w	75	1,05	51	2	20	25	Bakt.
5	m	79	1,21	58	0	0	0	
6	w	67	0,98	57	0	0	0	Bakt.
7	m	78	2,78	22	3	30	0	Bakt.
8	w	80	0,98	55	0	0	0	
9	w	75	0,76	74	1	10	-	Urat
10	m	63	2,04	33	2	20	75	
11	m	60	0,97	79	1	10	25	
12	m	78	2,78	22	6	60	25	Bakt.
13	m	73	1,75	38	1	10	0	
14	m	77	2,62	24	2	20	0	
15	m	77	0,92	80	1	10	-	

16	m	77	1,06	68	5	50	25	
17	w	53	0,35	195	3	30	0	
18	m	60	1,1	68	0	0	0	
19	w	55	0,41	161	2	20	-	
20	m	71	1,27	56	1	10	0	
21	w	76	0,45	135	3	30	25	Bakt./Urat
22	w	47	0,83	74	4	40	0	
23	m	77	0,93	79	3	30	0	
24	w	41	0,57	117	0	0	0	Bakt.
25	w	82	1,49	34	0	0	0	
26	w	53	0,85	70	1	10	0	
27	w	85	0,78	70	0	0	0	
28	m	47	0,99	81	2	20	0	
29	m	56	0,7	117	0	0	25	
30	w	76	0,76	74	0	0	0	
31	m	49	0,86	94	0	0	0	
32	m	78	1,49	46	0	0	0	
33	m	66	1,91	35	2	20	75	
34	w	50	0,74	83	0	0	0	
35	w	74	2,01	24	3	30	25	Bakt.
36	w	69	0,93	60	24	240	25	Bakt.
37	m	68	0,85	89	0	0	0	
38	w	74	2	24	18	180	150	
39	w	64	0,68	87	0	0	0	
40	m	80	1,2	58	0	0	0	
41	w	77	1,02	53	2	20	0	
42	w	68	0,69	85	0	0	0	
43	m	66	1,49	47	1	10	0	
44	m	53	1,07	72	0	0	0	
45	m	71	1,37	51	0	0	0	
46	w	84	1,15	45	8	80	75	
47	w	59	0,67	90	0	0	0	
48	m	71	1,51	46	0	0	0	
49	w	75	0,79	71	0	0	0	
50	m	78	1,3	53	4	40	0	
51	m	73	0,99	74	0	0	0	
52	m	72	1,33	53	1	10	0	
53	m	71	1,18	71	0	0	0	
54	w	76	1,35	38	23	230	150	
55	w	84	1,15	45	0	0	0	
56	m	60	1,2	62	0	0	0	
57	w	50	0,87	69	0	0	0	
58	m	85	2,58	24	17	170	0	
59	m	83	5,6	20	9	90	0	
60	w	81	1,01	53	0	0	0	
61	w	78	0,86	64	0	0	0	
62	w	50	0,8	76	0	0	0	
63	w	75	0,95	57	1	10	0	
64	m	64	0,81	96	0	0	0	
65	m	56	0,7	117	0	0	0	
66	w	85	1,04	50	5	50	0	
67	m	71	1,45	48	0	0	0	
68	w	77	2,94	20	0	0	75	
69	m	65	1,38	52	3	30	0	
70	w	74	1,44	36	0	0	0	
71	w	55	1,34	41	27	270	0	
72	w	75	0,59	99	0	0	0	
73	m	63	1,28	57	0	0	0	

74	m	54	0,88	90	0	0	0	
75	m	79	3,38	20	6	60	75	
76	m	64	1,04	72	0	0	0	
77	w	90	1,12	46	13	130	25	
78	w	74	1,44	36	0	0	0	
79	m	82	1,08	60	0	0	0	
80	w	63	0,37	176	0	0	0	
81	m	87	0,66	114	5	50	0	
82	m	59	2,99	22	1	10	75	
83	m	67	1,28	56	2	20	0	
84	w	79	0,93	58	0	0	0	
85	w	81	0,79	70	0	0	0	
86	m	85	1,74	38	16	160	0	
87	w	77	2,92	20	1	10	0	
88	m	72	0,86	87	0	0	0	
89	m	54	1,34	56	0	0	0	
90	m	59	2,59	26	11	110	75	
91	w	61	0,75	79	0	0	0	
92	w	64	0,64	93	0	0	0	
93	w	79	1,03	52	3	30	0	
94	m	78	1,31	53	4	40	0	
95	w	65	0,57	106	0	0	0	
96	m	63	0,68	118	2	20	0	
97	w	63	0,59	103	1	10	0	
98	m	55	0,98	79	0	0	0	
99	m	74	1,09	66	0	0	0	
100	w	76	0,86	64	5	50	0	
101	m	71	0,77	100	0	0	0	
	MW	69,3	1,26	65,5	3,2	31,9	12,4	8 x Bakterien
	SD	10,7	0,76	32,5	7,2	72,4	29,8	3 x Uratkristalle
	SEM	1,07	0,08	3,25	0,72	7,24	3,05	
	n	101	101	101	101	101	97	
Altersspanne		41-90						

Marcumar		Häufigkeitsanalyse	
Erys/ μ l	Klassen	Häufigkeit	Häufigkeit in %
0 bis	1	51	51
1 bis	10	12	12
10 bis	20	10	10
20 bis	30	7	7
30 bis	40	3	3
40 bis	50	4	4
50 bis	60	3	3
60 bis	80	1	1
80 bis	100	1	1
100 bis	120	1	1
120 bis	140	1	1
140 bis	160	1	1
160 bis	180	2	2
180 bis	200	0	0
200 bis	220	0	0
220 bis	240	2	2
240 bis	260	0	0
260 bis	280	1	1
>280		1	1
	Summe	101	101

Tabelle 8.4.: Patientenkollektiv unter Acetylsalizylsäure (ASS) zur Thrombozyten-Aggregationshemmung (Standarddosis 100mg). Im Vergleich zum Marcumar-Kollektiv lag die Mikrohämaturie im Mittel höher. Das Altersmittel lag in allen drei Kollektiven mit Antikoagulations-Therapie im Bereich von 69 Jahren.

Mikrohämaturie ASS 100 Gesamtkollektiv								
lfd Nr	Geschlecht	Alter Jahre	S-Kreatinin mg%	eGFR ml/min	Erys gezählt	Erys/ μ l	U-Protein mg%	Besonder- heiten
1	m	73	1,11	65	2	20	-	
2	m	51	0,67	125	45	450	-	
3	m	72	0,74	104	6	60	-	Urat
4	m	70	0,88	86	2	20	-	
5	m	83	1,09	65	5	50	0	
6	m	73	1,11	65	3	30	-	
7	m	51	0,67	125	2	20	0	
8	m	70	1,15	63	3	30	-	
9	m	62	2,67	24	2	20	-	
10	m	58	0,83	95	3	30	-	
11	m	80	0,95	76	2	20	0	
12	m	82	1,18	59	7	70	-	
13	m	75	1,1	65	5	50	-	
14	m	83	1,2	58	8	80	0	
15	m	70	2,69	54	9	90	-	
16	m	57	1,11	68	15	150	-	
17	m	60	2,84	66	3	30	-	
18	m	56	1,14	66	2	20	-	
19	m	55	0,63	132	1	10	0	Bakt./ Urat
20	m	76	1,21	58	6	60	25	
21	m	75	1,22	58	3	30	25	
22	m	75	1,88	35	2	20	-	
23	m	66	0,74	106	34	340	-	Bakt.
24	m	44	0,71	121	3	30	-	
25	m	58	0,98	79	1	10	0	
26	m	65	0,71	111	1	10	-	
27	m	54	1,19	64	0	0	-	
28	m	87	1,39	48	2	20	0	Bakt.
29	m	62	0,78	101	7	70	-	Urat
30	m	83	0,87	84	2	20	25	
31	m	81	3,32	18	1	10	0	
32	m	71	1,02	72	1	10	0	
33	m	72	1,02	72	2	20	0	
34	m	61	0,71	113	1	10	-	
35	m	56	0,77	105	0	0	-	
36	m	60	3,87	16	3	30	75	
37	m	76	1,33	52	1	10	0	
38	m	52	0,7	118	0	0	-	Urat
39	m	69	0,72	108	5	50	25	Bakt.
40	m	81	1,18	59	1	10	-	Bakt.
41	m	68	0,95	79	5	50	-	
42	m	53	0,82	98	0	0	0	
43	m	68	0,97	77	1	10	-	Bakt./Urat
44	m	57	1,15	66	0	0	-	
45	m	31	0,8	113	1	10	-	
46	m	69	1,35	52	6	60	0	
47	m	46	0,86	96	0	0	-	
48	m	90	1,53	43	3	30	-	
49	m	56	1,09	70	3	30	0	Bakt.

50	m	81	1,02	70	1	10	-	
51	m	61	0,99	77	0	0	-	
52	m	77	0,88	84	13	130	-	
53	m	74	0,97	76	3	30	0	
54	m	69	0,9	84	5	50	-	Bakt./Urat
55	m	60	3,87	16	0	0	75	Bakt.
56	m	67	1,85	37	1	10	-	
57	m	62	0,85	91	2	20	-	
58	m	79	1,36	51	2	20	0	
59	m	87	0,81	90	4	40	0	
60	m	68	2,14	31	3	30	75	
61	m	60	0,7	115	0	0	0	
62	m	61	0,6	137	0	0	0	
63	m	80	1,67	41	5	50	0	Bakt.
64	w	59	0,55	113	120	1200	75	
65	w	62	0,74	106	74	740	-	
66	w	56	0,88	66	0	0	-	Urat
67	w	85	1,31	39	14	140	0	
68	w	71	0,67	87	5	50	25	
69	w	82	0,78	71	9	90	0	
70	w	72	0,86	65	6	60	-	
71	w	82	0,73	76	9	90	-	
72	w	70	0,77	74	2	20	0	
73	w	83	1,3	39	7	70	-	
74	w	41	0,69	94	3	30	-	
75	w	78	1,26	57	11	110	-	
76	w	70	0,8	71	6	60	0	
77	w	88	1,01	52	3	30	25	
78	w	38	0,51	135	1	10	-	
79	w	93	1,02	51	1	10	0	
80	w	79	0,87	63	0	0	0	
81	w	74	0,99	55	0	0	-	
82	w	75	0,98	55	1	10	-	
83	w	75	0,93	59	2	20	0	
84	w	74	1,02	53	18	180	-	
85	w	70	0,81	70	0	0	-	
86	w	75	0,93	59	6	60	0	
87	w	88	0,83	65	1	10	-	
88	w	75	1,67	30	8	80	25	
89	w	69	1,06	51	0	0	0	
90	w	76	0,84	66	2	20	25	
91	w	49	0,5	131	0	0	-	Bakt./Urat
92	w	69	1,09	50	3	30	0	
93	w	78	1,6	31	7	70	25	
94	w	80	0,83	66	5	50	0	Bakt.
95	w	89	1,25	40	2	20	25	Bakt.
96	w	91	0,95	55	2	20	0	
97	w	71	0,78	73	0	0	0	
98	w	69	1,09	50	3	30	0	Bakt.
99	w	85	1,07	49	3	30	-	Bakt.
100	w	76	1,02	53	1	10	0	
101	w	85	1,36	37	0	0	0	Leukozyten
102	w	78	1,2	43	1	10	25	
103	w	63	1,03	54	0	0	0	Bakt.
104	w	29	0,91	68	0	0	0	

	MW	69,2	1,13	70,9	5,72	57,2	10,8	14 x Bakterien
	SD	12,9	0,60	27,7	14,5	145,2	20,9	1 x Leukozyten
	SEM	1,27	0,06	2,73	1,43	14,30	2,9	8 x Uratkristalle
	n	104	104	104	104	104	53	
	Altersspanne		29-93					

ASS 100 Gesamtkollektiv		Häufigkeitsanalyse	
Erys/µl	Klassen	Häufigkeit	Häufigkeit in %
0 bis	1	20	19,2
1 bis	10	18	17,3
10 bis	20	17	16,3
20 bis	30	16	15,4
30 bis	40	1	0,96
40 bis	50	8	7,7
50 bis	60	6	5,8
60 bis	80	6	5,8
80 bis	100	3	2,9
100 bis	120	1	0,96
120 bis	140	2	1,92
140 bis	160	1	0,96
160 bis	180	1	0,96
180 bis	200	0	0
200 bis	220	0	0
220 bis	240	0	0
240 bis	260	0	0
260 bis	280	0	0
	>280	4	3,8
	Summe	104	100,0

Tabelle 8.5.: Patientenkollektiv unter ASS und Clopidogrel (Plavix®).

Mikrohämaturie ASS & Clopidogrel Gesamtkollektiv								
lfd Nr	Geschlecht	Alter Jahre	S-Kreatinin mg%	eGFR ml/min	Erys gezählt	Erys/ μ l	U-Protein mg%	Besonder- heiten
1	m	70	1,14	64	20	200	-	
2	m	64	0,74	106	15	150	-	
3	m	58	0,72	112	5	50	-	
4	m	61	1,53	45	2	20	25	
5	m	72	1,31	54	0	0	0	
6	m	75	0,98	75	1	10	-	
7	m	65	1,49	47	4	40	0	
8	m	43	1,04	78	1	10	-	
9	m	58	0,84	94	3	30	-	
10	m	69	1,02	72	2	20	0	
11	m	68	0,95	79	2	20	-	Bakt.
12	m	25	0,82	114	2	20	0	
13	m	67	0,57	143	103	1030	-	
14	m	77	0,88	84	6	60	-	
15	m	53	0,9	88	3	30	0	
16	m	69	0,71	110	2	20	25	Bakt.
17	m	72	2,8	22	0	0	-	
18	m	71	0,9	83	2	20	30	Leuk.
19	m	17	0,9	111	0	0	0	
20	m	74	0,86	87	2	20	0	
21	m	48	1,07	74	2	20	0	Urat
22	m	62	0,7	114	0	0	0	
23	m	62	0,81	97	1	10	0	Bakt.
24	m	73	0,66	118	0	0	0	
25	m	75	0,92	80	0	0	0	Bakt.
26	m	76	0,91	81	1	10	0	Bakt.
27	m	83	1,35	50	0	0	30	
28	m	67	1,24	58	0	0	0	
29	w	58	0,91	63	40	400	-	
30	w	69	0,87	65	2	20	-	Bakt.
31	w	74	1,47	35	0	0	0	
32	w	55	0,78	77	4	40	-	Bakt.
33	w	85	1,23	41	2	20	-	
34	w	66	0,82	70	16	160	-	
35	w	82	1,24	41	42	420	25	
36	w	80	1,14	46	0	0	-	
37	w	81	1,04	51	8	80	0	Bakt.
38	w	84	1,27	40	4	40	25	
39	w	77	1,14	46	0	0	-	
40	w	76	1,24	42	20	200	0	
41	w	75	0,96	57	3	30	-	
42	w	70	0,85	66	0	0	0	
43	w	85	1,15	45	4	40	-	
44	w	78	0,91	60	5	50	150	Leuk.
45	w	67	0,71	82	2	20	0	
46	w	58	0,79	75	0	0	0	Leuk./Bakt.
47	w	49	0,63	100	6	60	0	
48	w	82	0,76	73	1	10	0	Bakt.
49	w	74	1,01	54	0	0	0	
50	w	76	0,61	95	15	150	30	Leuk./Bakt.
51	w	73	1,7	29	2	20	25	

	MW	67,6	1,02	72,4	7,0	69,6	11,4	11 x Bakterien
	SD	13,5	0,36	26,3	16,2	161,7	27,5	4 x Leukozyten
	SEM	1,9	0,05	3,76	2,3	23,1	5,0	1 x Uratkristalle
	n	51	51	51	51	51	32	
	Altersspanne		17-85					

ASS & Clopidogrel-Kollektiv		Häufigkeitsanalyse	
Erys/ μ l	Klassen	Häufigkeit	Häufigkeit in %
0 bis	1	17	33,3
1 bis	10	5	9,8
10 bis	20	12	23,5
20 bis	30	3	5,9
30 bis	40	4	7,84
40 bis	50	2	3,92
50 bis	60	2	3,92
60 bis	80	1	1,96
80 bis	100	0	0
100 bis	120	0	0
120 bis	140	0	0
140 bis	160	2	3,92
160 bis	180	0	0
180 bis	200	1	1,96
200 bis	220	0	0
220 bis	240	0	0
240 bis	260	0	0
260 bis	280	0	0
	>280	2	3,92
		51	99,9

Tabellen 8.6.: Mittelwerte der Patientendaten zur Mikrohämaturie. Vergleich Kontrolle zu Patienten-Kollektiven unter Antikoagulationstherapie.

Kontrolle	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/ μ l	U-Protein	Besonder-
	Jahre	mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	49,6	0,85	93,1	0,13	1,25	4,3	10 x Bakterien
SD	22,3	0,26	29,5	0,43	4,32	18,5	10 x Leukozyten
SEM	2,20	0,03	2,91	0,04	0,43	1,82	
n	104	104	104	104	104	104	
Altersspanne	7-94						

Marcumar®	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/ μ l	U-Protein	Besonder-
		mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	69,3	1,26	65,5	3,2	31,9	12,4	8 x Bakterien
SD	10,7	0,76	32,5	7,2	72,4	29,8	3 x Uratkristalle
SEM	1,07	0,08	3,25	0,72	7,24	3,05	
n	101	101	101	101	101	97	
Altersspanne	41-90						

ASS 100	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/ μ l	U-Protein	Besonder-
	Jahre	mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	69,2	1,13	70,9	5,7	57,2	10,8	14 x Bakterien
SD	12,9	0,60	27,7	14,5	145,2	20,9	1 x Leukozyten
SEM	1,3	0,06	2,73	1,4	14,3	2,9	8 x Uratkristalle
n	104	104	104	104	104	53	
Altersspanne	29-93						

ASS & Plavix	Alter	S-Kreatinin	eGFR	Erys	Erys/ μ l	U-Protein	Besonder-
	Jahre	mg%	ml/min	gezählt		mg%	heiten
MW	67,6	1,02	72,4	7,0	69,6	11,4	11 x Bakterien
SD	13,5	0,36	26,3	16,2	161,7	27,5	4 x Leukozyten
SEM	1,9	0,05	3,7	2,3	22,9	4,9	1 x Uratkristalle
n	51	51	51	51	51	32	
Altersspanne	17-85						

Die Unterschiede im mittleren S-Kreatinin und der eGFR sind den Unterschieden in der Altersverteilung zuzuordnen.

Tabelle 8.7: Mittelwertstatistik zur Abb. 4.2.5. Grad der Mikrohämaturie der Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrolle.

Kontrolle n=104			Marcumar n=101			ASS n=104			ASS & Plavix n=51		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
1,25	0,430	104	31,90	7,20	101	57,20	14,30	104	69,60	22,90	51

Statistische Analyse zur Mikrohämaturie unter Antikoagulationstherapie im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv. Anova Varianz Analyse (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) mit anschließendem Tukeys Test.

Table Analyzed	Mikrohämaturie Antikoagulantien CDE m/w					
One-way analysis of variance						
P value		0,0002				
P value summary		***				
Are means signif. different? (P < 0.05)		Yes				
Number of groups		4				
F		6,780				
R square		0,05404				
Bartlett's test for equal variances						
Bartlett's statistic (corrected)		624,9				
P value		< 0.0001				
P value summary		***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)		Yes				
ANOVA Table		SS	df	MS		
Treatment (between columns)		231570	3	77190		
Residual (within columns)		4,053e+006	356	11386		
Total		4,285e+006	359			
Tukey's Multiple Comparison Test		Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Kontrolle n=104 vs Marcumar n=101		-30,65	2,908	No	ns	-69.45 to 8.147
Kontrolle n=104 vs ASS n=104		-55,95	5,347	Yes	**	-94.46 to -17.44
Kontrolle n=104 vs ASS&Clopidogrel n=51		-68,35	5,299	Yes	**	-115.8 to -20.88
Marcumar n=101 vs ASS n=104		-25,30	2,400	No	ns	-64.10 to 13.50
Marcumar n=101 vs ASS&Clopidogrel n=51		-37,70	2,909	No	ns	-85.41 to 10.01
ASS n=104 vs ASS&Clopidogrel n=51		-12,40	0,9614	No	ns	-59.87 to 35.07

9. Danksagung

Meinem ehemaligen Chef Prof. Dr. Armin Rost danke ich für die Vermittlung der Möglichkeit, das Projekt auf Anregung und mit Unterstützung von Prof. Schurek und Prof. Schlatter durchführen zu können.

Alle klinischen Untersuchungen zum Einfluss von Antikoagulantien auf die Hämaturie konnte ich vor Ort im Labor der urologischen Abteilung am Bonifatius-Hospital in Lingen durchführen.

Herrn Prof. Schurek und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Nephrologie Frau Rita Schröter, Herrn Dr. Jens Klokkes und Frau Antje Stöber danke ich für die Einführung und den Einblick in die Technik der Nierenperfusion und die Bereitstellung der Proben für die Zellanalyse in den vorbereiteten Urinproben, die ich in Lingen im Labor analysiert habe.

Das Ambulanzteam der Urologie in Lingen hat mich ebenso unterstützt wie das Sekretariat, damit die experimentellen Proben kühl bis zum Termin der Auswertung gelagert wurden sowie Patientenproben aussortiert in meine Hände gelangten.

Die Rekrutierung der Patienten für die Urinproben unter Antikoagulantien von der Gefäßchirurgischen Station in Lingen haben die Chefärzte Dr. Hartmut Görtz und Dr. Jörg Teßarek und das Stationsteam ebenso ermöglicht wie die Auswertung der Patientendaten aus dem Labor- und Datenarchiv und dafür bedanke ich mich. Gleichmaßen gilt der Dank auch Prof. Dr. Wolfgang Grosse-Heitmeyer und dem Team der Kardiologischen Ambulanz.

Besonderer Dank geht an meine Familie für die motivierende Unterstützung, diese Arbeit neben der klinischen Tätigkeit und dem familiären Alltag zu ermöglichen.

10. Curriculum vitae

11. Erklärung nach §2 Abs. 4 der Promotionsordnung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab,

dass ich den klinischen Teil dieser Dissertation selbstständig angefertigt habe und bei dem experimentellen Teil dieser Dissertation ich die Möglichkeit wahrgenommen habe, den experimentellen Aufbau zur Nierenperfusion in der Abteilung Experimentelle Nephrologie zu studieren und das mir zur Verfügung gestellte Probenmaterial zur Zellanalyse auszuwerten,

dass ich die Dissertation nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet habe,

dass ich keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe,

dass ich weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät die Arbeit als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe und

dass die Promotionsordnung mir bekannt ist.

Viktor Repp



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Prof. Dr. Eberhard Schlatter
Medizinische Klinik und Poliklinik D
Experimentelle Nephrologie
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1; Geb. A14
48149 Münster

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

Fachbereich84@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

84-02.05.20.11.257

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 05.12.2011

Tierschutz;

Anzeige nach § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 Tierschutzgesetz (TSchG)

- a) Zuständigkeitsverordnung vom 26. September 1989 (GV NW 1989 S. 508)
- b) Ihre Anzele vom 28.11.2011; eingegangen am 01.12.2011

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schlatter,

Ihre o. g. Anzeige zu dem Versuchsvorhaben

**„Organentnahme für die experimentelle Nierentransplantation zur
Untersuchung von Abstoßungsreaktionen“**

wird hiermit bestätigt.

Verantwortlicher Versuchsleiter ist: Herr Prof. Dr. Eberhard Schlatter

Stellvertretender Versuchsleiter: Herr PD Dr. med. Stefan Reuter

**Weitere beteiligte Personen: Herr Dr. med. Alexander Grabner, Herr Dipl.-
Biol. Dominik Kentrup und Frau Rita Schröter**

Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 9 Abs. 1 Satz 3 des TierSchG nicht erfüllen, dürfen erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 des TierSchG eingesetzt werden.

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 oder 237 bis

Haltestelle "LANUV" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12

Art und Zahl der Tiere: 450 Ratten

Dauer des Versuchsvorhabens: 01.04.2012 bis zum 31.03.2015

**Ort: Zentrale Tierexperimentale Einrichtung des Universitätsklinikums
Münster**

Ändern sich während des Versuchsvorhabens die von Ihnen in Ihrer Anzeige angegebenen Sachverhalte, so sind mir diese unverzüglich anzuzeigen.

Nach § 8 a Abs. 3 Tierschutzgesetz ist mir am Ende eines jeden Jahres die Zahl der durchgeführten Versuchsvorhaben sowie bei Wirbeltieren Art und Zahl der insgesamt verwendeten Wirbeltiere anzugeben.

Von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr wird abgesehen, da die Tierversuche überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage erhoben werden. Die Klage ist schriftlich vor dem Verwaltungsgericht Münster (Piusallee 38, 48147 Münster) oder zur Niederschrift beim Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.

Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Hieronymus
(Dr. Hieronymus)