

## *Kurzmitteilungen und Methodisches*

Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin  
und dem Physiologischen Institut der Universität Göttingen

### **Methode zur Durchströmung einzelner Nephronabschnitte\***

Von

**H. SONNENBERG** und **P. DEETJEN**  
unter technischer Mithilfe von **W. HAMPEL**

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 23. Oktober 1963)*

Mit Hilfe der Mikropunktionstechnik ist in den letzten Jahren die Nierenphysiologie um wichtige Erkenntnisse bereichert worden. Bestimmte Untersuchungen jedoch, wie die lokaler Transportraten von Elektrolyten und Nichtelektrolyten oder Permeabilitätsmessungen von Wasser und gelösten Substanzen, ließen sich mit der Mikropunktionstechnik ebenso wie mit der Clearance-Methodik nicht befriedigend klären. Alle diese Größen lassen sich nur dann exakt messen, wenn die Messungen unabhängig von der glomerulären Filtration ausgeführt werden.

Die Entwicklung einer Mikrotechnik, bei der ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen intratubulär injiziert, wieder herausgesaugt und analysiert wird<sup>5,6</sup>, war ein erster Versuch in dieser Richtung. Diese Methode konnte aber nur am Kaltblüter zu Erfolgen führen, bei dem die tubulären Transportprozesse relativ langsam ablaufen. Beim Warmblüter erlaubte diese Methode zwar die Analyse von Gleichgewichtszuständen<sup>2-4</sup>, hingegen nicht von dynamischen Vorgängen, da hier die Transportgeschwindigkeiten zu hoch sind. Zur Untersuchung der Transportkinetik am Warmblüternephron bedarf es vielmehr einer Methode, mit der die Tubuli fortlaufend, konstant und unabhängig vom Glomerulumfiltrat durchströmt werden können. Auch hierin hat es an Bemühungen nicht gefehlt. Neben einer einfachen Durchströmung vermittelt einer an die Punktionscapillare angeschlossenen handbetätigten Injektionsspritze<sup>5</sup> wurde von SOLOMON<sup>7</sup> eine Methode angegeben, bei der aus einer Mikrocapillare durch Windkesseldruck Flüssigkeit in ein Tubuluslumen ausgetrieben wird. Für

\* Mit Unterstützung einer Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft und eines N.I.H. Research Grant No. AM 06806-01.

Untersuchungen jedoch, in denen es auf exakt reproduzierbare Perfusionenraten auch in den niedrigen Stromstärkebereichen ankommt, genügte die mit einer Drucksteuerung erzielbare Konstanz und Genauigkeit der Mikroperfusionen nicht.

Im folgenden soll eine Apparatur beschrieben werden, mit der eine solche konstante Perfusion in vivo et situ möglich ist, und zwar mit Perfusionenraten, die beliebig variierbar sind und bis herunter zu einem Fünftel der normalen intratubulären Harnstromstärke exakt einstellbar sind.

### Die Mikroperfusionspumpe

Ein Asynchronmotor dreht über ein Getriebe mit einer Übersetzung von 1:16000 einen Stahlstift in den Schaft einer Mikropunktionscapillare. Wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, wird die Basis der Capillare durch

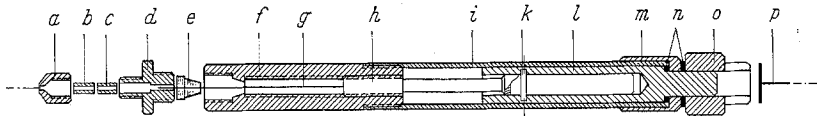


Abb. 1. Schnittzeichnung der Mikroperfusionspumpe. Die Perfusionscapillare wird mit Hilfe der Spannmutter *a*, des Druckstiftes *b* und des Dichtungsgummis *c* in die Capillarführung *d* eingespannt. Die Führung wird in die Pumpenhülse *f* eingeschraubt, wodurch das Teflonstück *e* zusammengedrückt wird und den Kolbenstift *g* abdichtet. In der Gabel der Kolbenspindel *h* gleitet der Kupplungsstift *k* der Kupplung *l*, der über die Gleitringe *n* und Verschraubung *m* mit der Motorwelle *p* verbunden ist

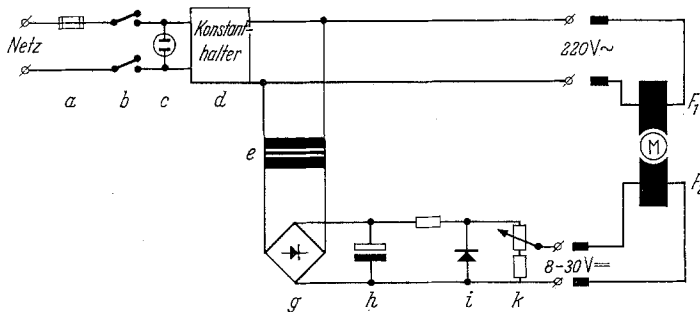


Abb. 2. Prinzipschaltung für den Pumpenmotor (Siemensregelmotor K2AJ3). Der Netzstrom wird über eine Sicherung *a* aus Schalter *b* und einem Anzeigelämpchen *c* einem magnetischen Spannungskonstanthalter *d* zugeführt. Dessen auf 220 V stabilisierte Ausgangsspannung wird einerseits der Antriebsfeldwicklung  $F_1$  des Regelmotors, zum andern über einen Transformator *e* einem Gleichrichter *g* zugeführt. Die so gewonnene Gleichspannung wird durch den Ladekondensator *h* geglättet und durch eine Leistungszehnerriode *i* abermals stabilisiert. Mit dieser konstanten Spannung wird über einen Spannungsteiler *k* die Bremsfeldwicklung  $F_2$  des Motors gespeist. Diese erzeugt in dem rotierenden Anker bremsende Wirbelströme

einen Teflonansatz abgedichtet. Schiebt sich nun der Stahlstift in das Lumen vor, so wird Flüssigkeit, mit der die Capillare gefüllt wurde, verdrängt und fließt an der Capillarspitze aus.

Die Drehzahl des Motors und damit die Höhe der Perfusionenrate läßt sich stufenlos über eine Bremsspannung regulieren (siehe Schaltbild

Abb. 2). Ein magnetischer Spannungskonstanthalter schließt Änderungen der eingestellten Motordrehzahl infolge Schwankungen in der Netzspannung aus. Die Mikroperfusionsapparatur ist auf einen handelsüblichen Leitz-Mikromanipulator montiert.

### Die Eichung

Direkte Messungen der intratubulären Harnstromstärke hatten je nach Funktionszustand der Niere für den proximalen Tubulus Werte zwischen 10 und  $35 \cdot 10^{-6}$  ml/min ergeben<sup>8</sup>. An diesen Bereich wurde die Perfusionsapparatur angeglichen.

Die Eichungen werden so vorgenommen, daß die Wanderungsgeschwindigkeit einer Wasser-Öl-Grenzfläche im Lumen der Mikrocapillare unter dem Mikroskop mit einem Ocularmikrometer gemessen wird. Aus dieser Geschwindigkeit und dem Lumendurchmesser der Capillare läßt sich dann die Perfusionsstromstärke errechnen. Die Perfusionsrate gegen die Potentiometereinstellung der Bremsvorrichtung aufgetragen, ergibt eine leichte S-förmige Krümmung der Eichkurve. Sie ist dadurch bedingt, daß die Motordrehzahl der Bremsspannung nicht linear folgt. Bleibt der Lumendurchmesser der Capillarspitze oberhalb eines Wertes von  $2 \mu$ , so spielt der Widerstand in der Capillarspitze für die Perfusionsstromstärke keine Rolle. Auch macht es keinen Unterschied, ob die Capillarspitze während der Eichung in ein Wasserbad eintaucht oder intratubulär liegt. Um eine konstante Perfusionsstromstärke zu erhalten, ist es jedoch erforderlich, die Capillarspitze in ein thermokonstantes Milieu eintauchen zu lassen, wobei nur die Temperaturkonstanz, nicht aber eine bestimmte Temperaturhöhe ausschlaggebend ist. Die Eichungen sind auch nach mehreren Monaten noch mit einer Abweichung von  $< 3\%$  gut reproduzierbar.

### Perfusion einzelner Nephronabschnitte

Die Niere des anaesthetisierten Versuchstieres (Ratte oder Goldhamster) wird in der bei Mikropunktionen üblichen Weise freigelegt. Für die Mikroperfusionstechnik ist neben der Perfusionsanordnung ein zweiter Mikromanipulator erforderlich, der eine mit gefärbtem Paraffinöl gefüllte Capillare trägt. Mit dieser Capillare wird zunächst ein Tubulus so weit proximal punktiert, daß durch einen in den tubulären Harnstrom injizierten kleinen Öltropfen noch mindestens zwei weiter distal gelegene Konvolutschlingen an der Nierenoberfläche erkennbar werden (Abb. 3). In die erste dieser Schlingen wird die Perfusionscapillare eingestochen und — bei schon laufender Perfusion — die zwischen beiden Capillaren liegende Tubulusschlinge mit Öl gefüllt. Die Ölcapillare wird dann aus der glomerulumnahen Punktionsstelle herausgezogen und in die am weitesten distal gelegene Schlinge gestochen. Infolge der langen Ölsäule proximal

der Perfusionscapillare wird das Perfusat nicht mit Glomerulumfiltrat vermischt. Das Glomerulumfiltrat kann durch die erste Punktionsstelle nach außen abfließen.

Eine andere Möglichkeit, Mikroperfusionen durchzuführen, bietet die Benutzung doppelläufiger Punktionscapillaren. Die eine Capillarbranche wird mit der Perfusionsflüssigkeit gefüllt und auf die Mikropumpe aufgesetzt, die andere Branche mit gefärbtem Öl gefüllt. Eine geeignete

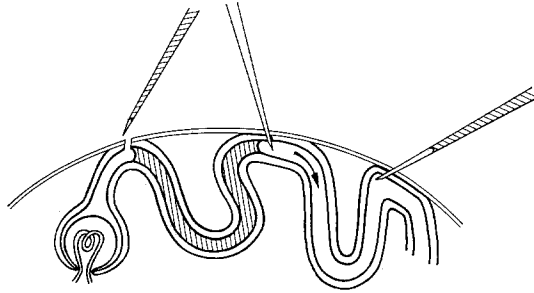


Abb. 3. Punktionsschema. Erklärung siehe Text

Tubuluschlinge wird so punktiert, daß die Capillarspitze dem intratubulären Harnstrom entgegengerichtet ist. Wird nun eine Ölsäule in Richtung auf das Glomerulum injiziert und dann die Perfusion begonnen, so wird durch den Perfusionsdruck der Filtrationsdruck kompensiert, die proximale Ölsäule bleibt proximal der Punktionsstelle unbewegt und verhindert eine Filtratbeimischung zum Perfusat.

Wird mit der gleichen Stromstärke perfundiert, wie sie normalerweise durch das Filtrat vorgegeben ist, so liegen die intratubulären Drucke in der Perfusionsstrecke des proximalen Konvolutes im Bereich normaler Werte zwischen 14 und 18 mm Hg. Auch die Lumenweiten werden nicht verändert und betragen im Mittel  $20\ \mu$ .

Perfusionen im distalen Konvolut sind schwieriger, aber möglich. Wegen der wenigen und nur kurzen Schlingen, die an der Nierenoberfläche sichtbar sind, empfiehlt sich zur Perfusion die Technik mit doppelläufigen Capillaren. Die niedrigste Perfusionsrate unserer Apparatur von  $10 \cdot 10^{-6}$  ml/min bedeutet für das distale Konvolut eine Stromstärke, wie sie nur bei starker Diurese anzutreffen ist<sup>8</sup>. Dementsprechend sind die Lumina auch bis zu  $25\ \mu$  aufgedehnt gegenüber einer Weite von  $9\ \mu$  in Antidiurese. Die intratubulären Drucke liegen im distalen Konvolut dann zwischen 25–35 mmHg.

Nach Beendigung der Perfusion wird die Perfusionsstrecke mit Neopren gefüllt und nach Maceration der Niere die Länge des betreffenden Nephronstückes mit Hilfe einer Mikrodissektion mikroskopisch ausgemessen. Aus mikrophotographischen Aufnahmen der Nierenoberfläche während der Perfusion lassen sich die Lumenweiten der Tubuli bestimmen und zur Berechnung der tubulären Kontaktfläche heranziehen.

### Anwendung und Grenzen der Methodik

Bislang sind konstante Perfusionen bis zu 30 min Dauer gelungen. Noch längere Zeit die Perfusions- und Absaugcapillaren in guter Position zu halten, ist schwierig. Von Zeit zu Zeit führen besonders tiefe Atemzüge der Versuchstiere trotz Fixierung der Niere in einem Plexiglasschälchen zu Lageänderungen der Capillarspitzen. In den meisten Fällen vergrößert sich dadurch die Punktionsöffnung und läßt sich nicht mehr abdichten. Um genügend Perfusionsflüssigkeit für mikrochemische Analysen aufzusaugen, genügen jedoch Perfusionszeiten von 10–15 min. Bei Nieren in gutem Funktionszustand zeigen sich auch nach 30 minütiger Perfusion keine sichtbaren Veränderungen an den Tubulusepithelien. Bei Nieren in schlechtem Funktionszustand sind schon nach kurzer Perfusionszeit weißliche Randbildungen an der Tubuluslumenseite zu beobachten, die möglicherweise auf eine Schädigung der Bürstensäume zurückzuführen sind.

Es sei hier angemerkt, daß bei diesen Untersuchungen — wie überhaupt bei Mikropunktionsversuchen — große Sorgfalt darauf zu legen ist, die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant zu halten. Durchblutungsmessungen mit einem unblutigen photoelektrischen Verfahren unter den gleichen Versuchsbedingungen wie während eines Mikropunktionsexperimentes haben gezeigt, daß von einer guten Erwärmung der Versuchstiere die Qualität der Experimente mitbestimmt wird (DEETJEN und BRECHTELSBAUER, unveröffentlichte Befunde). Die Körpertemperatur einer Ratte, die im Mittel 38°C beträgt, sinkt unter Barbituratnarkose auf etwa 34°C ab. Die Durchblutung der Nierenrinde ist dann auf die Hälfte abgesunken. Dabei kann der Blutdruck noch eine normale Höhe haben und auch die Tubuli können noch normal gefüllt erscheinen. Die intratubuläre Harnstromstärke allerdings ist dann auch etwa auf die Hälfte abgesunken<sup>8</sup>. Um einen solchen Temperaturschock zu vermeiden, muß das Versuchstier durch ein elektrisches Heizkissen o.ä. von allen Seiten erwärmt werden. Behält auf diese Weise die Körpertemperatur ihren normalen Wert, können Mikropunktionsuntersuchungen bei guter Nierenfunktion über einen Zeitraum von 6–8 Std ausgeführt werden.

Das geschilderte Verfahren der Mikroperfusion bietet den Vorteil, daß unabhängig vom Glomerulumfiltrat isoliert einzelne Tubulusabschnitte mit Lösungen beliebiger Zusammensetzung konstant perfundiert werden können. Änderungen des Perfusates durch tubuläre Resorption oder Sekretion sind quantitativ meßbar.

Diese Methode eröffnet eine Möglichkeit, die tubuläre Transportkinetik von Elektrolyten und Nichtelektrolyten in situ zu untersuchen und sie erscheint geeignet, Mechanismen tubulärer Resorption und Sekretion aufzuklären. Über erste Ergebnisse mit der Technik der Mikroperfusion ist bereits kurz berichtet worden<sup>1,9</sup>.

### Zusammenfassung

Es wird eine Mikroperforationsapparatur beschrieben, mit der konstante Perfusionsraten zwischen 10 und  $35 \cdot 10^{-6}$  ml/min eingestellt werden können. Mit Hilfe dieser Apparatur können Teile eines Nephrons in

situ kontinuierlich durchströmt werden. Die angegebene Technik erlaubt Tubulusperfusionen, ohne daß Beimischungen von Glomerulumfiltrat das Perfusat verändern, so daß Messungen lokaler, tubulärer Transportraten von Elektrolyten und Nichtelektrolyten oder Permeabilitäten von Wasser und gelösten Substanzen möglich sind.

Prof. Dr. K. J. ULLRICH und Dr. K. H. GERTZ, Berlin, haben wir für die Anregung zu dieser Arbeit und wertvolle Ratschläge sehr zu danken.

### Literatur

- <sup>1</sup> DEETJEN, P., u. H. SONNENBERG: PAH-Transport im proximalen Konvolut des Warmblüterneurons. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **278**, 48 (1963).
- <sup>2</sup> GERTZ, K. H., u. K. J. ULLRICH: Methode zur Analyse des Stofftransportes am einzelnen Tubulus der intakten Rattenniere. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **274**, 61 (1961).
- <sup>3</sup> KASHGARIAN, M., H. STÖCKLE, C. W. GOTTSCHALK and K. J. ULLRICH: Trans-tubular electrochemical potentials of sodium and chloride in proximal and distal renal tubules of rats during antidiuresis and water diuresis (Diabetis insipidus). *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **277**, 89 (1963).
- <sup>4</sup> MARSH, D. J., K. J. ULLRICH and G. RUMRICH: Micropuncture analysis of the behavior of potassium ions in rat renal cortical tubules. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **277**, 107 (1963).
- <sup>5</sup> RICHARDS, A. N., and A. M. WALKER: Methods of collecting fluid from known regions of the renal tubules of amphibia and of perfusing the lumen of a single tubule. *Amer. J. Physiol.* **118**, 111 (1937).
- <sup>6</sup> SHIPP, J. C., I. B. HANENSON, E. E. WINDHAGER, H. J. SCHATZMANN, G. WHITTEMBURY, H. YOSHIMURA and A. K. SOLOMON: Single proximal tubules of the *Necturus* kidney. Methods for micropuncture and micropfusion. *Amer. J. Physiol.* **195**, 563 (1958).
- <sup>7</sup> SOLOMON, S.: A method for investigating net water fluxes across individual proximal tubules. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **101**, 221 (1959).
- <sup>8</sup> THURAU, K., u. P. DEETJEN: Kinematographische Untersuchungen am Warmblüterneuron. *Nachr. Akad. Wissensch. Göttingen* **2**, 27 (1961).
- <sup>9</sup> ULLRICH, K. J., u. G. RUMRICH: Direkte Messung der Wasserpermeabilität kortikaler Nephronabschnitte bei verschiedenen Diuresezuständen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **278**, 44 (1963).

Priv.-Doz. Dr. PETER DEETJEN,  
Physiologisches Institut der Universität, 34 Göttingen, Kirchweg 7